MÖSSBAUERSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM TRANSPORT VON SIDEROPHOREN AN NEUROSPORA CRASSA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors

der Naturwissenschaften

der Fakultät Biologie

der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt

von

BERTHOLD F. M. MATZANKE

aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1982

1981

82 56

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548903_0010

MÖSSBAUERSPEKTROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN ZUM TRANSPORT VON SIDEROPHOREN AN NEUROSPORA CRASSA

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
der Fakultät Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt
von

BERTHOLD F. M. MATZANKE

aus Stuttgart-Bad Cannstatt

1982

Tag der mündlichen Prüfung: 17. November 1981

Dekan:	Prof. Dr. H.-U. Schnitzler
1. Berichterstatter	Prof. Dr. G. Winkelmann
2. Berichterstatter	Prof. Dr. V. Hoffmann

UNIV. LEIDEN BIBL.

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, daß ich diese Arbeit ohne unerlaubte Hilfsmittel angefertigt und bis jetzt noch keinen Promotionsversuch unternommen habe.

Bo. Klaid F. H. Hahnke

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.G. Winkelmann am Institut für Biologie, Lehrstuhl Mikrobiologie I (Prof.Dr.H. Zähner), Herrn Prof.Dr.W. Zeil (†) und Herrn Prof.Dr.V. Hoffmann, Institut für Theoretische und Physikalische Chemie, der Universität Tübingen durchgeführt.

Für die Akzeptierung des Themas, die stetige Förderung der Arbeit und zahlreichen Diskussionen und Ratschläge danke ich Herrn Prof.Dr.G. Winkelmann,Herrn Prof.Dr.V. Hoffmann und Prof.W.Zeil in memoriam.

Meiner Freundin Gertraud danke ich in Liebe für die psychische und moralische Stärkung in Zeiten der Stagnation; aber auch dafür, daß nur durch sie der Gegenstand dieser Arbeit Gestalt annehmen konnte.

Für die Sicherung des Lebensunterhalts während dieser Zeit durch ein Promotionsstipendium sei der Friedrich-Ebert-Stiftung und für großzügige Unterstützung nach Ablauf der Förderung sei Prof.H. Zähner mein Dank ausgesprochen.
Für die zahlreichen erleuchtenden Diskussionen, bereitwillige Hilfe und Überlassung von Rechenprogrammen danke ich herzlich Herrn Prof.Dr.A.Trautwein und Herrn Dipl. Phys. E.Bill vom Institut für Angewandte Physik der Universität des Saarlandes, Saarbrücken.

Auch allen Freunden und Kollegen, die mir bei der Erstellung der Arbeit in der einen oder anderen Weise behilflich waren, möchte ich hier aufrichtig danken.

M O T T O

" WAHRLICH, NICHT VON ANFANG HABEN DIE GOETTER DEN STERBLICHEN ALLES ENTHÜLLT, SONDERN MIT DER ZEIT FINDEN SIE SUCHEND DAS BESSERE."

XENOPHANES

" BEI DER ERFAHRUNG KOMMT ES DARAUF AN, MIT WELCHEM SINN MAN AN DIE WIRKLICHKEIT GEHT. EIN GROSSER SINN MACHT GROSSE ERFAHRUNGEN UND ERBLICKT IN DEM BUNTEN SPIEL DER ERSCHEINUNGEN DAS, WORAUF ES ANKOMMT."

HEGEL

" DIE NATURFORSCHER MÖGEN SICH STELLEN, WIE SIE WOLLEN, SIE WERDEN VON DER PHILOSOPHIE BEHERRSCHT. ES FRAGT SICH NUR, OB SIE VON EINER SCHLECHTEN MODEPHILOSOPHIE BEHERRSCHT WERDEN WOLLEN ODER VON EINER FORM DES DIALEKTISCHEN DENKENS, DIE AUF DER BEKANNTSCHAFT MIT DER GESCHICHTE DES DENKENS UND MIT DEREN ERRUNGENSCHAFTEN BERUHT."

ENGELS

M E M E N T O

"Wenn Wissenschaftler, eingeschüchtert durch selbstsüchtige Machthaber, sich damit begnügen, Wissen um des Wissens willen aufzuhäufen, kann die Wissenschaft zum Krüppel gemacht werden, und eure neuen Maschinen mögen nur neue Drangsal bedeuten. Ihr mögt mit der Zeit alles entdecken, was es zu entdecken gibt, und euer Fortschritt wird doch nur ein Fortschreiten von der Menschheit weg sein.
Die Kluft zwische euch und ihr kann eines Tages so groß werden, daß euer Jubelschrei über irgendeine neue Errungenschaft von einem universalen Entsetztensschrei beantwortet werden könnte."

Bertolt Brecht (Leben des Galilei)

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	1
II.	THEORIE	12
II.1.	DIE GEOMETRIE DER SIDEROPHORE	12
II.1.1.	Der Eisen-Sauerstoff-Oktaeder	15
II.1.2.	Das Gesamtmolekül: Notwendigkeit und Vorschlag einer erweiterten Nomenklatur	19
II.1.3.	Systematik einkerniger Fe-Trihydroxamatkomplexe. Trans-Isomere bei Coprogen?	22
II.2.	DIE MÜSSBAUERPARAMETER	26
II.2.1.	Isomerieverschiebung	28
II.2.2.	Quadrupolaufspaltung (P)	3o
II.2.3.	Der Einfluß des Kristallfeldes	32
II.2.3.1.	Die Nullfeld (Kristallfeld)-Aufspaltung von S-Ionen	32
II.2.3.2.	Kramers'sche Entartung	33
II.2.3.3.	Die Kristallfeldparameter	34
II.2.3.4.	Kritik der literaturüblichen Verwendung des Kristallfeld-Hamiltonoperators	38
II.2.4.	Zeeman- und Kristallfeldterm	4o
II.2.5.	Hyperfeinwechselwirkung	41
II.2.6.	Das Hyperfein-Spektrum. Berechnung des Spinhamiltonoperators	45
III.	MATERIAL UND METHODEN	52
III.1.	CHEMIKALIEN	52
III.2.	VERSUCHSORGANISMEN	53
III.3.	ANZUCHTBEDINGUNGEN FÜR MYCELBILDENDE NEUROSPORA CRASSA STÄMME	53
III.4.	ISOLIERUNG UND MARKIERUNG DER SIDEROPHORE	54
III.4.1.	Gewinnung von Coprogen	55
III.4.2.	Reinigung von Coprogen	55
III.4.3.	Überprüfung der Reinheit von Coprogen	56
III.4.4.	Reinigung der übrigen Siderophore	56

III.4.5.	Herstellung von Desferrisiderophoren	56
III.4.6.	Herstellung von ^{55}Fe-Siderophoren	56
III.4.7.	Herstellung von $^{57}Fe_2(SO_4)_3$	57
III.4.8.	Herstellung von ^{57}Fe-Siderophoren	57
III.5	^{55}Fe-SIDEROPHOR'AUFNAHMEVERSUCHE AN MYCEL BILDENDEN STÄMMEN	57
III.6.	MÖSSBAUERSPEKTROSKOPISCHE MESSUNGEN DER ^{57}Fe- SIDEROPHORAUFNAHME	58
III.6.1.	Problem einer ausreichenden Resonanznuklidkonzentration	58
III.6.2.	^{57}Fe-Siderophor-Aufnahme	6o
III.6.3.	Das Mößbauerspektrometer	61
III.6.4.	Mößbauerspektroskopische Messungen und Auswertung	63
III.6.4.1.	Durchführung der Messungen	63
III.6.4.2.	Maschinelle Auswertung der Spektren	64
III.7.	MAGNETISCHE MESSUNGEN	67
IV. ERGEBNISSE		69
IV.1.	SYMMETRIE UND ELEKTRONISCHE STRUKTUR DER SIDEROPHORE	69
IV.1.1.	CD-Spektren zu Ermittlung der Chiralität des Eisen-Zentrums	69
IV.1.2.	Magnetisch Messungen	73
IV.1.3.	pH- und Lösungsmitteleinfluß auf die ESR-Spektren von Coprogen und Ferricrocin	75
IV.1.4.	Mössbauerspektren der Siderophore. Phänomenolgie und Berechnung	81
IV.1.4.1.	Temperaturabhängigkeit	81
IV.1.4.2.	Feldabhängigkeit	87
IV.1.4.3.	Konzentrationsabhängigkeit	89
IV.1.4.4.	Berechnung der Tieftemperaturspektren. Die Mössbauerparameter	96
IV.1.4.5.	Raumtemperaturmessungen weiterer Siderophore	1o7

IV.2.	UNTERSUCHUNGEN ZUM VERLAUF DER SIDEROPHOR EISENAUFNAHME BEI N. CRASSA	111
IV.2.1.	^{55}Fe-Siderophor-Aufnahme	111
IV.2.2.	Untersuchung des Kulturfiltrats nach Coprogen-Inkubation	114
IV.2.3.	Mössbauerspektroskopische Verfolgung der ^{57}Fe-Coprogenaufnahme durch N.crassa	116
IV.2.3.1.	Coprogeninkubation von 10 Minuten Dauer	116
IV.2.3.2.	20 Minuten Coprogenaufnahme	117
IV.2.3.3.	Die Verhältnisse nach 30 Minuten. Fe(II).	117
IV.2.3.4.	2 Stunden Coprogen-Inkubation	121
IV.2.3.5.	Vierstündige Coprogen-Aufnahme	124
IV.2.4.	^{57}Fe-Ferricrocinaufnahme durch N. crassa	127
V. DISKUSSION		131
V.1.	DIE MOLEKULAREN PARAMETER DER SIDEROPHORE. SCHLUSSFOLGERUNGEN ÜBER DIE MECHANISMEN DER ERKENNUNG	131
V.1.1.	Energetische Überlegungen	132
V.1.2.	Die Wirkung einzelner Molekülgruppen auf die Molekülparameter und die Aufnahme durch N. crassa	136
V.1.2.1.	Seringruppen-Wirkung auf das Eisenzentrum und die Siderophoraufnahme durch N. crassa	137
V.1.2.2.	Reste an Hydroxamatgruppen - Wirkung auf das Eisenzentrum und die Aufnahmekinetik bei N. crassa	141
V.1.3.	Ein oder zwei Aufnahmesysteme?	144
V.2.	ÜBER DIE MECHANISMEN DER SIDEROPHOR-EISEN-AUFNAHME BEI N. CRASSA	146
V.2.1.	Modelle des aktiven Transports	146
V.2.2.	Die Doppelfunktion des Coprogens: Eisen-aufnahme und Eisenspeicherung	15o
V.2.3.	Ferricrocin - ein Eisenspeicher besonderer Art	154

VI. MODELL UND ZUSAMMENFASSUNG 156

VII. LITERATURVERZEICHNIS 159

I. EINLEITUNG

Wegen seiner zentralen Rolle im Stoffwechsel ist Eisen für alle Organismen lebensnotwendig. Die Verfügbarkeit von Eisen ist ein entscheidender Faktor für die Art des Wachstums, der Zellmorphologie und des Stoffwechsels bei Mikroorganismen (1-3) .
Die Zahl der Enzyme, die Eisen enthalten oder für ihre Aktivität eine Eisenpräsenz erfordern, ist zahlreich. Außer den Cytochromen und Ferredoxinen sind Eisenschwefelproteine, Oxigenasen, Flavoproteine etc. zu nennen. Auch die Stickstofffixierung über Nitrogenasen von aeroben und anaeroben Mikroorganismen erfordert Eisen (4,5) . Selbst der Metabolismus der Nukleinsäuren wird von der Eisenpräsenz beeinflußt. Eisenmangelzellen von Mycobacterium smegmatis weisen einen veränderten DNA und RNA-Gehalt auf (6). Bei Bacillus subtilis bewirkt Ferrioxamin B-Zugabe Blockierung der DNA-Synthese (7). Bei bestimmten t-RNA-Spezies konnten im Eisenmangel Strukturänderungen beobachtet werden (8,9) Die wichtigste Funktion hat Eisen in den Häm-und Nichthämproteinen der Atmungskette, wo es der Energiegewinnung der Zelle dient.

Seit sich in der Evolution der Erde die vormals reduzierende Atmosphäre durch Sauerstoff produzierende Blaualgen in eine oxidierende Atmosphäre verwandelte, ist Eisen für Organismen nur noch schwer zugänglich. Das Löslichkeitsprodukt von $Fe(OH)_2$ bei 25°C beträgt $1o^{-15}$, während $Fe(OH)_3$ eine Konstante des Löslichkeitsprodukts von $1,1x10^{-36}$ (1o) bzw. von $10^{-38.7}$ (11) hat. Meist liegen Fe(III)-Ionen als ebenso unlösliche Polymere $Fe_2O_3xnH_2O$ mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von $1,4x10^5$ vor (12).

Um sich dieses Eisen trotzdem für den Stoffwechsel verfügbar zu machen, haben Mikroorganismen, soweit bekannt ist, besondere Aufnahmesysteme für Eisen entwickelt, die sich

allgemein in zwei Gruppen einteilen lassen:

a) Ein niedrig affines, relativ unspezifisches Aufnahmesystem über organische Säuren, z.B. Citrat (13-15).

b) Ein hochaffines, sehr spezifisches Aufnahmesystem, für das speziese eigene Eisenchelatoren ausgeschieden werden, die Siderochrome bzw. Siderophore (16-21).

Siderophore sind kleinmolekulare Substanzen, mit einem Molekulargewicht <1000 Dalton, deren Phenolat- bzw. Hydroxamatgruppen, die Fe(III)-Ionen lösen und mit hoher Komplexbildungskonstante ($\sim 10^{30}$) komplexieren können. Sie werden von Mikroorganismen unter Eisenmangelbedingungen in der eisenfreien Form, als Desferrisiderophore ausgeschieden (20).

Mikroorganismen produzieren eine Vielzahl von Siderophoren, die hier nicht vollständig aufgezählt werden sollen. Einige Fungi imperfecti, Ascomycetes und Basidiomycetes synthetisieren Hydroxamate, die entweder zur Ferrichromgruppe gehören, wie Ferrichrom, Ferricrocin, Ferrichrysin und Ferrirubin, oder Hydroxamate, die Esterbindungen enthalten, wie Coprogen, Fusigen, oder Triacetylfusigen (22). Ein typischer Vertreter der Phenolatgruppe ist das Enterobactin, das für E.coli und Salmonella typhimurium charakteristische Siderophor (18-2o).

Die Bedeutung der Siderophore geht, wie man heute weiß, in der Natur weit über die Sicherung der Eisenversorgung des Produzenten hinaus. So stellte man fest, daß die für Pflanzen nützlichen Stickstoffixierer (Rhizobakterien) gleichzeitig verhindern, daß sich pflanzenpathogene Bakterien und Pilze ansiedeln können, indem sie einen sehr effektiven Eisenchelator ausscheiden. Dies führt bei den anderen Organismen einen Eisenmangelzustand herbei, da sie diesen Komplex nicht aufnehmen können (23).
In Bodenproben wurden große Mengen an Siderophoren gefunden, und man schließt daraus, daß auch Pflanzen z.T. Siderophore aufnehmen können (23).
Die Konkurrenz um das Eisen scheint auch für die Pathogenität einiger Bakterien in Säugern eine große Rolle zu spie-

len. Das eisenkomplexierende Protein im Serum ist das Transferrin. Dadurch wird die Konzentration an freiem Eisen im Blut sehr gering gehalten, was eine gewisse Bakteriostase bewirkt. Bei Mäusen, denen geringe Mengen Eisen gespritzt wurde, reichte eine um 3 - 5 Zehnerpotenzen geringere Dosis an pathogenen Keimen aus, um 50% der Versuchstiere zu töten. Die Keime vermehrten sich im Blut auf Zahlen, die einige tausendfach über denen der Kontrolltiere ohne Eisen lagen (24).

Siderophore sind vermutlich für pathogene Keime ein wichtiges Mittel, um sich das Eisen des Wirtsorganismus verfügbar zu machen (25).

Im medizinischen Bereich werden einige Siderophore wie Desferrioxamin B und Rhodutorulasäure bei Eisenspeicherkrankheiten und medikamentösen Eisenvergiftungen eingesetzt, um eine verstärkte Eisenausscheidung zu bewirken (26).

Sowohl bei Bakterien, als auch bei Pilzen wurden inzwischen sehr intensiv die Eisenaufnahmesysteme untersucht. Aufgrund der sehr hohen Spezifität der Siderochrom-vermittelten Eisenaufnahme kann ausgeschlossen werden, daß die Passage durch die Zellmembran allein durch eine partielle Lipidlöslichkeit der Siderochrome bedingt ist. Vielmehr lassen die Saturierbarkeit der Aufnahmekinetik, die Hemmbarkeit durch Inhibitoren des Energiestoffwechsels und durch SH-Gruppen alkylierende Agentien annehmen, daß es sich um einen Membranprotein-abhängigen, aktiven Aufnahmevorgang handelt (15,16, 18,27-30).

Bei E.coli und Salmonella typhimurium konnte durch Mutanten die Beteiligung mehrerer Proteine an der Siderophoraufnahme nachgewiesen werden: In der äußeren E.coli-Membran lokalisierte Rezeptorproteine, z.B. das feu-Genprodukt für Enterobactin (82), Ton A und Protein II für Ferrichrom (27) und Proteine im periplasmatischen Raum (Ton B) (82,84). Die Passage durch die innere Membran ist wenig untersucht (85).

Wichtig ist vor allem, daß die äußeren Rezeptorproteine bei E.coli gleichzeitig Adsorptionsstellen für Colicine und Phagen sind, was weitreichende Fragen zur Bindungsspezifität

aufwirft (86).

Versuche zur Bestimmung der Zahl der Aufnahmesysteme bei Pilzen wurden bisher noch nicht durchgeführt, dies ist auch besonders schwierig, da es keine Transport-defekten Mutanten gibt. Bei N.crassa wurden Bindeproteine für Coprogen gefunden, eine Charakterisierung der Rezeptoreigenschaften nach Isolation und Reinigung möglich (29).

Rezeptor-bzw. Transportproteine haben mindestens vier Funktionen zu erfüllen: Erkennung, Bindung und Translokation des Siderophors und gleichzeitig die Kopplung mit dem Energiestoffwechsel. Ohne Isolierung der jeweiligen Rezeptorproteine können Aussagen über die Spezifität der Adsorption resp. Aufnahme, d.h. über die Mechanismen der molekularen Erkennung nur über eine Korrelation von Aufnahmecharakteristik und den molekularen Eigenschaften der jeweiligen Siderophore gewonnen werden. Insbesondere interessieren folgende Fragen:

- Sind strukturelle, energetische oder dynamische(kinetische Größen für Erkennung /Bindung und Transport entscheidend?
- Wird das Molekül als Ganzes erkannt, oder sind lediglich bestimmte Gruppen für die Erkennung verantwortlich; z.B. periphere Reste oder das Fe-Zentrum, dessen Symmetrie und elektronische Struktur.

Durch Messung der Transportraten und durch kompetetive Hemmung wurden Aussagen zur Spezifität der Siderophor-Aufnahme bei Pilzen abgeleitet: Mit spezieseigenen und speziesfremden Chelatoren, durch gezielte chemische Veränderung des Liganden und durch Substitution des Eisenions durch andere Metallionen.

So nimmt N.crassa bevorzugt Coprogen auf, kann jedoch auch Siderophore des Ferrichromtyps aktiv anreichern (88). Während jedoch Ferricrocin eine sehr hohe Transportrate zeigt, wird Ferrirubin und Ferrichrom A praktisch nicht aufgenommen. Ferrirubin hat eine hohe Affinität zum Aufnahmesystem und blockiert möglicherweise die Adsorptionsstellen (88).

Semisynthetische Coprogenderivate wie N-Propionyl- und N-Buturylcoprogen B zeigen gegenüber Coprogen (N-Acetyl-Coprogen B) sogar eine Zunahme der Transportraten bei N.crassa. Eine weitere Verlängerung des lipophilen Seitenrestes und strukturelle Modifikation der Hydroxylgruppen am Coprogen führen dagegen zu einer Abnahme des Transports (28).

Eine Abnahme der Transportraten des Ferrichroms konnte Emery bei Ustilago sphaerogena ebenfalls erst feststellen, als die N-Acetylgruppen direkt um das Eisenzentrum durch sehr ausgedehnte Acylreste substituiert wurden (23).

Die Substitution des Eisens am Coprogen durch andere dreiwertige Metallionen ergab zwar eine Veränderung der Transportraten, diese konnten jedoch nicht mit der Größe der Atomradien korreliert werden (15).

Ein eindeutigeres Selektionsvermögen zeigte sich bei Aufnahme- bzw. Adsorptionsversuchen mit Ferrichrom und seinem synthetisch hergestellten Enantiomeren. Bei N.crassa und P.parvum ergab sich eine konzentrationsabhängige Sättigungskinetik nur mit dem natürlich vorkommenden Ferrichrom, während die Werte für Enantioferrichrom nur langsam und proportional zur Konzentration anstiegen. Aus zeitabhängigen Versuchen muß geschlossen werden, daß die Enantio-Form nur adsorbiert (83,87). Im Gegensatz dazu wurden von E.coli beide Ferrichrom-Isomere aufgenommen, das Enantioferrichrom allerdings mit geringerer Rate. Diese geringere Spezifität ist wohl auf die Multifunktionalität des Ferrichromrezeptors bei E.coli zurückzuführen, an den - wie schon erwähnt - auch verschiedene Phagen und Colicine adsorbieren (87). Das gleiche gilt für die Enterobactinaufnahme. Aus Kompetitionsexperimente zwischen Enterobactin(Δ-cis) und aus D--Serin synthetisiertem Enantioenterobactin(Λ-cis), sowie zwischen Enantioenterobactin und Colicin B, wurde der Schluß gezogen, daß nicht nur der Transport, sondern auch die Bindung des synthetischen Enantiomeren gegenüber dem natürlichen Enterobactin stark erniedrigt ist (89).

Neben der Charakterisierung der Eisentransportsysteme selbst, ist ein weiterer wichtiger Problemkreis das Schicksal des aufgenommenen Eisenchelaters in der Zelle. Für die Weiterverwertung des Eisens im mikrobiellen Stoffwechsel muß das Eisen dekomplexiert und reduziert werden. Dabei sind drei Möglichkeiten denkbar:

1. Der Eisenkomplex wird enzymatisch gespalten und das Eisen reduziert.
2. Das Eisen wird durch eine Reduktion dekomplexiert, da die Bindungskonstante der Siderochrome für Fe(II) um ca. 20 Zehnerpotenzen geringer ist als für Fe(III) (20).
3. Der Komplex wird am eisenbindenden Zentrum so verändert, daß die Bindungsaffinität abnimmt.

Emery isolierte lösliche Ornithinesterasen bei Fusarium und Penicillium specialis, die Fusigen und Triacetylfusigen spalten (90). Bei N.crassa konnten solche spaltenden Enzyme nicht beobachtet werden. Das Abbauprodukt des Coprogen (Dimerumsäure) taucht erst bei 5 Tage altem Mycel auf, was nicht mehr im Zusammenhang mit einem eisenverwertenden Schritt gebracht werden kann (91,92). Dafür wurde aber eine NADH-abhängige Oxido-Reduktase im Cytoplasma lokalisiert, die die Reduktion von Coprogen katalysiert (93).

Auch bei verschiedenen Bakterien, wie Bacillus megaterium (95), Pseudomonas aeruginosa (94) und Mycobacterium smegmatis (21) wurden Eisen-Reduktasen im Cytoplasma entdeckt. Ein besonderer Fall scheint bei E.coli vorzuliegen. Hier ist die Möglichkeit einer NADH-abhängigen Reduktion des Enterobactins nicht ohne weiteres einsehbar. Im Gegensatz zu Ferrichrom hat das Enterobactin bei pH 7 ein sehr hohes Redoxpotential (-750 mV), das weit über den physiologischen Maximalwerten der intrazellulären Reduktasen liegt, die etwa bei - 350 mV rangieren (96). Fest steht nur, daß das Enterobactin über das Dimer zum monomeren Baustein, dem 2,3-Dihydroxybenzoylserin abgebaut wird (97). Die Erniedrigung des hohen Redoxpotentials wird möglicherweise schon an der Cytoplasmamembran durch den pH-Gradienten erreicht, der den ener-

getisierten Membranzustand aufrecht erhält. ESR- und Mößbauerspektroskopische Messungen in vitro ergaben in methanolischer Lösung bei pH 1 intrinsische Reduktion (98, 121).

Aus verschiedenen Streptomycetenspezies wurden die o-Nitrosophenolverbindungen Viridomycin A und Actinoviridin A isoliert. Sie sind in der Lage Fe(III) den Siderophoren Ferrioxamin B und Ferrimycin A reduktiv unter Bildung von Fe(II)-Komplexen zu entreißen (99). Über den intrazellulären Eisenmetabolismus ist ansonsten wenig bekannt.

Da Mikroorganismen das aufgenommene Eisen bis zur 200-fachen Konzentration des Außenmediums anreichern (20), ist es sehr wahrscheinlich, daß auch ein Teil des Eisens als Vorrat gespeichert wird. So isolierte man Ferritin aus Phycomyces (20), als auch aus E.coli (100). Ferritin ist das Eisenspeicherprotein sowohl bei Pflanzen als auch bei Tieren. Es scheint auch bei Mikroorganismen eine Rolle zu spielen, obwohl in E.coli nur 1% des aufgenommenen Eisens ferritinähnlich gespeichert wird (100). Bei Pflanzen und Pilzen haben die Vakuolen eine besondere Rolle bei der Kompartimentierung von ionischen Molekülen. Aminosäuren, Kationen und Phosphate werden in hohen Konzentrationen in den Vakuolen gespeichert, wobei Polyphosphate als "Ionenaustauscher" wirken und Kationen binden und neutralisieren (101-105). Bei N.crassa konnte eine Kompartimentierung des Eisens in Vakuolen durch Aufnahmeversuche an isolierten Vakuolen ausgeschlossen werden (106).

Ein weiterer wichtiger Problemkomplex ist die Kopplung des Siderophortransports an den Energiestoffwechsel der Zelle. Leider existieren hier noch recht ungenaue Vorstellungen. Die Ergebnisse sind z.T. widersprüchlich, was auf die Komplexität der Aufnahmeprozesse schließen läßt.

Bei Eukaryonten ist die Atmungskette in den Mitochondrien lokalisiert und kann die Energie nur in Form von ATP für den Transport bereitstellen. In der Plasmamembran sind ATP-asen lokalisiert, die durch ATP-Hydrolyse Ionen-bzw. Protonengradienten über der Membran aufbauen, so daß diese sich

in einem "energetisierten" Zustand befindet. Der elektrochemische Gradient, der bei tierischen Zellen in Form einer Na^+- K^+ - Ungleichverteilung (122), bei N.crassa durch einen H^+ - Gradienten erhalten wird, scheint bei vielen Transportprozessen eine sehr wichtige Rolle zu spielen. Bei N.crassa sind der Zuckertransport, der Ionen- und Aminosäuretransport davon abhängig (123-126).

Eine weitere Möglichkeit der Energiekopplung ist wie bei Bakterien eine vektorielle Phosphorylierung des Aufnahmesystems bzw. des Substrats durch energiereiche Phosphate, wobei ATP eine wichtigere Rolle zu spielen scheint als andere Phosphatdonatoren (122, 127, 128). Da bei einigen Zellen auch Redox-Komponenten aus der Plasmamembran isoliert werden konnten, ist auch dieser Kopplungsmechanismus in Betracht zu ziehen (129).

Bei N.crassa konnte gezeigt werden, daß Hemmstoffe der Plasmamembran-ATPase, die bei anderen Transportvorgängen eine wichtige Funktion bei der Energetisierung hat, den Coprogentransport bei N.crassa nicht hemmen. D.h. die Coprogenaufnahme wird - obwohl es sich eindeutig um einen Energie verbrauchenden Transport handelt - nicht primär über den intrazellulären ATP-Spiegel reguliert (106).

Die vorliegende Arbeit verfolgt hauptsächlich drei Fragen:

1.) Können aus einem Vergleich der molekularen Eigenschaften der Siderophore mit den, durch ^{55}Fe-Labelmessungen gewonnenen Aufnahmecharakteristika Aufschlüsse über die Art der Erkennung und Bindung durch den Rezeptor gewonnen werden. Bestimmen strukturelle, elektronisch-energetische oder kinetische Parameter den Prozeß der Adsorption und Aufnahme?
2.) Kann als treibende Kraft der Aufnahme die Reduktion des Eisens gelten?
3.) Was geschieht mit dem ^{55}Fe-Coprogen, bzw. mit dem freien Eisen in der Zelle?

Da die bisher vorgenommenen ^{55}Fe-Labeluntersuchungen lediglich Auskunft darüber geben können, ob sich Eisen in irgendeiner Form in oder an der Zelle befindet, ist für die Beantwortung der drei Fragen ein neues Instrumentarium vonnöten.

Betrachtet man das Eisenatom als Sonde, dann ist die Mößbauer-Spektroskopie eine ideale Ergänzung um z.T. sehr detaillierte Informationen zu erlangen. Da die s-Elektronen der Hülle und in einem geringeren Maße und indirekt auch p- und d-Elektronen eine sehr kleine, aber vorhandene Aufenthaltswahrscheinlichkeit am Kernort haben, beeinflussen sie die Kernresonanzabsorption des ^{57}Fe-Kerns. Damit sind Aussagen über die Elektronendichte der Valenzschale des Eisens möglich, insbesondere über die Oxidationsstufe, sowie high-spin-und low-spin-Zustände. Da die Verhältnisse der Valenzschale auch durch die Liganden beeinflußt werden, können aus Mößbauerspektren auch Schlußfolgerungen über die Symmetrie, sowie Um-und Dekomplexierungen gezogen werden. Aus einer Analyse der Spin-Spin-Kopplungen zwischen den Eisenzentren und dem damit zusammenhängenden Relaxationsverhalten sind Rückschlüsse auf die Konzentrationsverhältnisse möglich.

Mößbauerspektroskopische Untersuchungen liegen von einer Vielzahl biologischer Systeme vor, insbesondere der oxidierten und reduzierten Form des Häm (107,108), der Cytochrome (109), der Eisen-Schwefel-Proteine wie Rubredoxin (33) und anderen 2-, 4- und 8-kernigen Ferredoxinen (109, 110). Auch die Eisenspeicherproteine Ferritin (116), Transferrin (111) sowie einige Enzymsysteme (112, 130) sind mößbauerspektroskopisch analysiert worden.

Die Mößbauerspektroskopie stellt eine äußerst materialschonende Untersuchungsmethode dar. Selbst unbehandelte Zell- oder Gewebeproben können verwendet werden, sofern die Nuklidkonzentration an ^{57}Fe groß genug ist. Leider mußte in der vorliegenden Arbeit aus konstruktionsbedingten Gründen mit gefriergetrockneten Zellen gearbeitet werden, was jedoch keine wesentliche Einschränkung für die hier behandelten Fragestellungen bedeutete.

Mößbaueruntersuchungen wurden schon an ganzen Zellen von E.coli (100), Proteus mirabilis (117) und Mycoplasma capricolum (118) durchgeführt, ebenso an menschlichen Gewebeproben (119,120). Die Beobachtung von zeitlichen Veränderungen von Eisenkomplexen in der Zelle unter Zuhilfenahme der Mößbauertechnik - wie es in dieser Arbeit versucht wurde - ist neu und stellt eine Erweiterung der Anwendungsmöglichkeiten dieser spektroskopischen Methode im biologisch-medizinischen Bereich dar.

Auch die Frage, ob der Eisen-Sauerstoff-Oktaeder, periphere Molekülgruppen oder die gesamte Molekülgestalt Erkennung und Aufnahme bestimmen, kann unter Einbeziehung der Mößbauerspektroskopie einer detaillierteren Prüfung unterzogen werden. Der Zustand des Eisenatoms einiger Siderophore, wie Ferrichrom A (113), Ferrioxamin B (114) und Enterobactin (115) wurde hinsichtlich seiner Hyperfeinstruktur schon genauer untersucht. Es stellte sich heraus, daß Fe(III) im high spin Zustand $^6S_{5/2}$ vorliegt und eine Feinstruktur in diesem Zustand aufweist. Die ESR-Signale der Fe(III)-Siderophore zeigen ein charakteristisches Signal bei g= 4,3 , das man häufig mit rhombischer Verzerrung der Eisenlage interpretiert.

Die HF-Struktur des Mößbauerspektrums dieser Paramagneten reagiert sehr empfindlich auf die Relaxationszeit des Elektronenspins des betreffenden Mößbaueratoms. Die elektronische Relaxation erfolgt einerseits wegen der Spin-Spin-Wechselwirkung zwischen den paramagnetischen Ionen. Sie kann dadurch minimiert werden, indem die Ionendichte durch einen diamagnetischen Stoff verringert wird. Zum anderen kann Relaxation durch Spin-Gitter-Wechselwirkung erfolgen, die i.a. dadurch beseitigt wird, indem die Experimente bei tiefen Temperaturen durchgeführt werden (4,2 K und manchmal noch tiefer).

Wenngleich diese Relaxationen die Interpretation der Spektren ohne Kenntnis der Konzentrations-, Feld- und Temperaturabhängigkeit erschweren oder unmöglich machen können, so sind umgekehrt zusätzliche Informationen erhältlich. Änderungen der Spin-Spin-Relaxation und die damit verbundenen drastischen Änderungen des spektralen Erscheinungsbildes können als hervorragende Sonde für die Fe-Fe-Abstände, d.h. für die lokale Konzentration der Siderophore dienen.

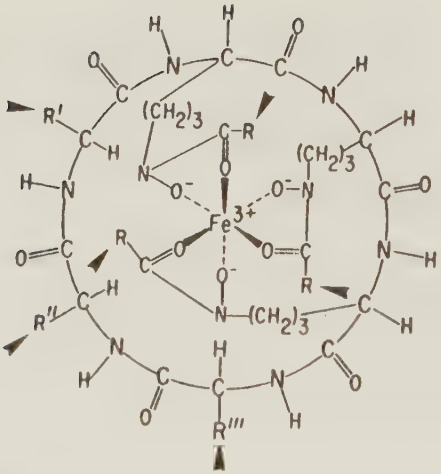
In dieser Arbeit wird erstmals der Versuch unternommen, zwischen ESR-und mößbauerspektroskopisch gewonnenen Parametern, ergänzt durch weitere molekulare Daten, und der Siderophor-Eisenaufnahme bei Mikroorganismen einen Zusammenhang herszustellen.

II. THEORIE

Im ersten Teil dieses Kapitels werden die stereochemischen Verhältnisse der Trihydroxamatsiderophore dargelegt, während der zweite Teil einen Abriß, der in dieser Arbeit benötigten mößbauerspektroskopischen Parameter liefert.

II.1. DIE GEOMETRIE DER SIDEROPHORE

Da das geregelte Funktionieren aller biologischer Prozesse auf molekularer Erkennung basiert, wie z.B. Enzymreaktionen, Steuerung über Hormonrezeptoren, die Proteinsynthese und die hier zu untersuchenden Transportprozesse, ist ein fundamentales Verständnis der spezifischen Selektion von Molekülen von großer Bedeutung. Für die Erkennung durch den Rezeptor ist ein hohes Maß an Komplementarität mit dem Substrat erforderlich. Genaue Kenntnisse über die Geometrie der Siderophore ist in diesem Zusammenhang von großer Bedeutung. Ihre sterischen Verhältnisse sind jedoch recht kompliziert. Die Probleme sollen deshalb kurz dargelegt werden, um im weiteren Text nicht über Maßen ausführlich werden zu müssen. Auf der Basis des vorliegenden Materials können außerdem zwei weitergehende theoretische Überlegungen vorgestellt werden. Die Abb. 1 und 2 zeigen die Strukturen der Siderophore, die im Folgenden genauer zu untersuchen sind.



Siderochrome	R′	R″	R‴	R
Ferrichrom	H	H	H	CH_3
Ferrichrysin	CH_2OH	CH_2OH	"	"
Ferricrocin	H	"	"	"
Ferrichrome A	CH_2OH	CH_2OH	"	$-CH=C(CH_3)-CH_2CO_2H$ (*trans*)
Ferrirubin	"	"	"	$-CH=C(CH_3)-CH_2-CH_2OH$

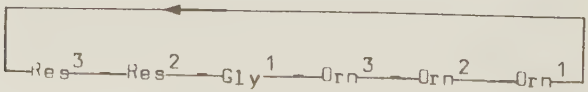
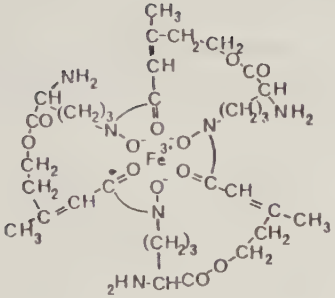
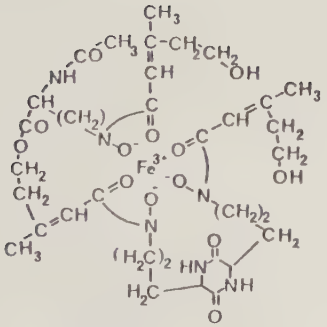


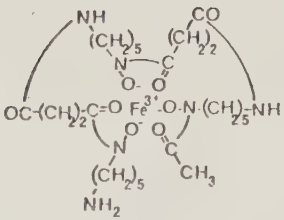
Abb. 1: Struktur von Siderophoren des Ferrichrom-Typs
Zur Verdeutlichung ist der Cyclohexapeptidring nochmals gesondert dargestellt.



Fusigen



Coprogen



Ferrioxamin B

Abb. 2: Weitere zyklische und lineare Trihydroxamat-Siderophore.

II.1.1. Der Eisen - Sauerstoff - Oktaeder

Betrachtet man die drei das Eisen in Form von drei fünfatomigen Ringen komplexierenden Hydroxamatgruppen, ohne die Anordnung der C- und N-Atome und sonstige weitere Verknüpfungen zu berücksichtigen, existieren 2 Spiegelbildisomere, die optisch aktiv sind. Nach IUPAC - Nomenklatur (148) werden diese mit Λ und Δ gekennzeichnet.

Zur Unterscheidung dieser 2 Isomeren geht man folgendermaßen vor: In Abb.3 erkennt man, daß das Λ - Isomere bei einer Rechtsdrehung um die C_3- Achse sich wie ein Propeller verhält, der in die Bildebene hineinbläst. Betrachtet man den selben Komplex von der anderen Seite der C_3- Achse und führt wiederum eine Rechtsdrehung durch, bleibt diese Eigenschaft erhalten. Führt man hingegen beim Δ - Isomeren eine Rechtsdrehung durch, bläst der Propeller aus der Bildebene heraus. Von der anderen Seite der C_3- Achse her gesehen, bleibt bei Rechtsdrehung das Ergebnis das selbe. Es ist also gleichgültig, von welcher Seite der C_3- Achse man inspiziert, da die Λ - und die Δ - Form in eindeutiger Weise unterscheidbar bleiben.

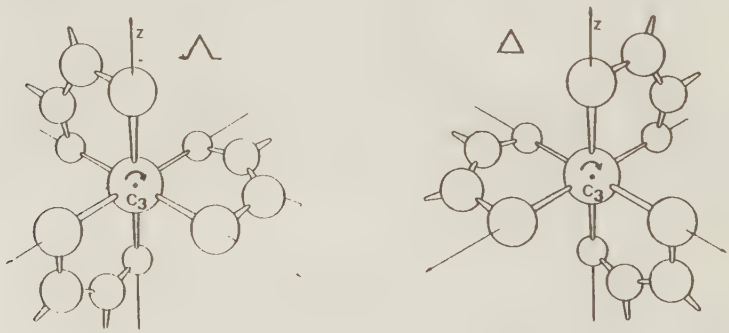
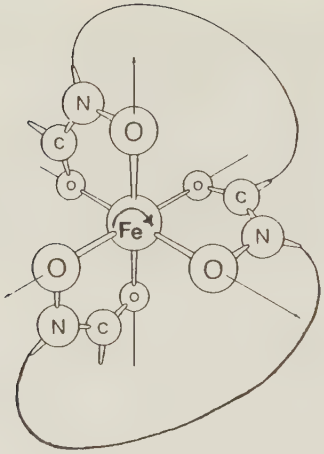


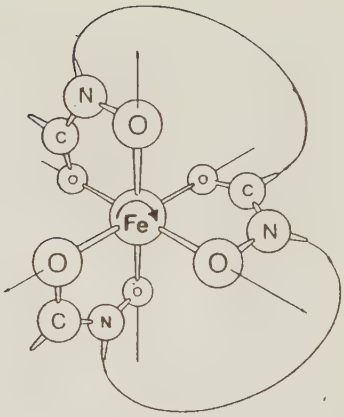
Abb. 3: Zur Verdeutlichung der optischen Isomerie von Eisen-Trihydroxamatkomplexen. Λ - und Δ - Propeller-Anordnung.

Ferner ist im Fe - O - Oktaeder noch eine geometrische Isomerie zu berücksichtigen. Die 6 Sauerstoffatome sind nämlich nicht äquivalent. Vielmehr besitzen 3 von ihnen eine formale Ladung. Zwei Anordnungen lassen sich dabei prinzipiell unterscheiden. Die Sauerstoffanionen können entweder facial, d.h. auf einer Oktaederfläche konzentriert sein, oder sie sind verteilt. Erstere Anordnung wird als geometrisches cis- Isomeres bezeichnet, letztere als trans- Isomeres.

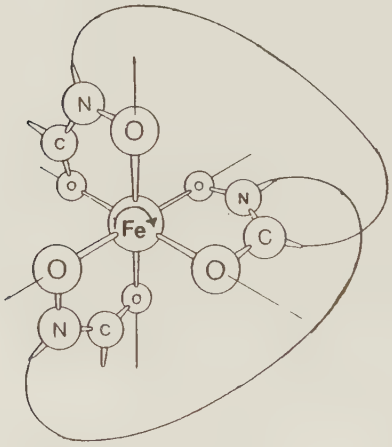
Berücksichtigt man nun die Tatsache, daß bei den Fe - Siderophoren die Chelatfünfringe durch äußere Ringe miteinander verknüpft sind, müssen die Anordnungen der C- und N- Atome der Hydroxamatgruppen berücksichtigt werden. Die Art der äußeren Verknüpfung bleibt an dieser Stelle noch unberücksichtigt. Behält man die Ringabfolge entsprechend der Rechtsdrehung um die C_3- Achse bei, wobei Ring 1 verbindungsspezifisch definiert werden muß, dann gibt es sowohl für die Λ - als auch für die Δ - Reihe prinzipiell 8 Isomere (s. Abb. 4). Die Nomenklatur ergibt sich nach Leong und Ramond (149) folgendermaßen: Wenn sich in Ring 1 in Drehrichtung das Kohlenstoffatom unterhalb des N befindet, wird dieses Isomere mit einem großen "C" notiert; im umgekehrten Fall mit "N". Die Ringe 2 und 3 werden nacheinander jeweils cis oder trans genannt, je nachdem, ob sie die gleiche oder die inverse Orientierung der C-und N- Atome in Drehrichtung aufweisen.



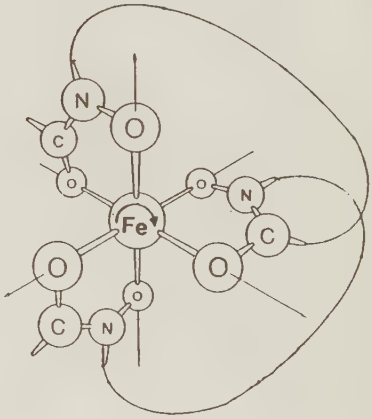
Λ-C - cis,cis



Λ-C - cis, trans



Λ-C - trans, cis



Λ-C - trans, trans

Abbildung 4

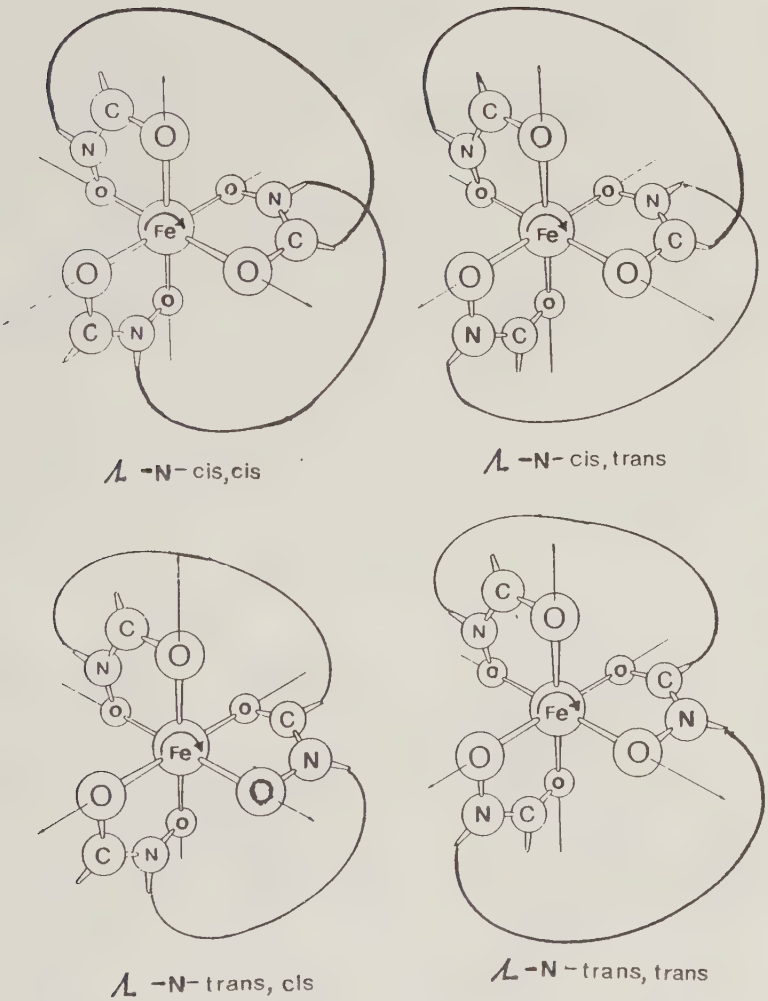


Abb. 4: Es werden die möglichen 8 Isomere der Λ -Reihe von Eisen-Trihydroxamatkomplexen gemäß der Leong-Raymond-schen Nomenklatur (s.Text) dargestellt. Es existieren ebenso viele Isomere der Δ - Reihe.

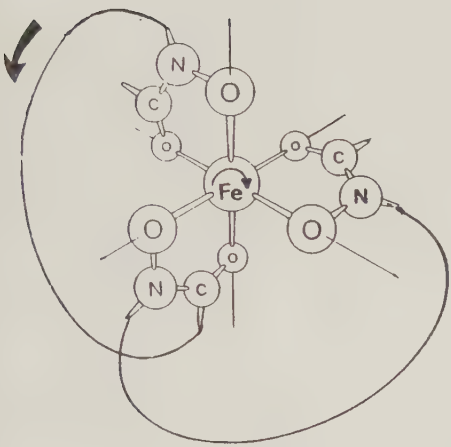
Bei zwei Isomeren, nämlich bei N - cis, cis und C - cis, cis befinden sich die negativen Ladungen auf einer Oktaederfläche; sie entsprechen also der ursprünglichen Bezeichnung "cis". Die übrigen 6 Isomeren können der "trans"- Anordnung zugeordnet werden. Obwohl - wie gezeigt - eine vollständige Nomenklatur zur Charakterisierung des Eisenzentrums sinnvoll ist, wird in der Literatur nach wie vor die simplifizierende cis/trans - Nomenklatur verwendet. Da die Problematik der cis/trans - Isomerie bzgl. der Rezeptor- und Aufnahmecharakteristika in der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht werden konnte, werde ich im Ergebnis- und Diskussionsteil ebenfalls die einfachere Nomeklatur benutzen.

In besonderen Fällen der äußeren Ringverknüpfung ist die Leong - Raymond'sche Nomenklatur nicht notwendig. Besteht nämlich kein chemischer Unterschied zwischen den großen, verküpfenden Ringen gilt: Λ -N-trans,trans = Λ -C-cis,trans = Λ -C-trans,cis ; Λ -C-trans,trans = Λ -N-cis,trans = Λ -N-trans,cis ; Λ -C-cis,cis = Λ -N-cis,cis. Es existieren in diesem Fall also 2 unterschiedliche trans - Strukturen und eine cis - Struktur.

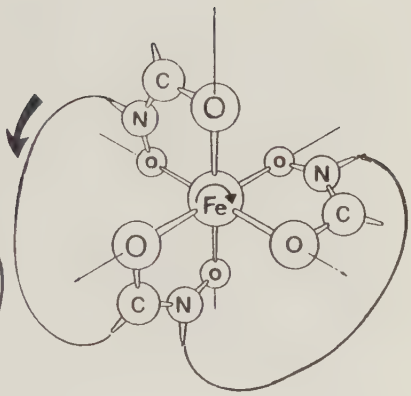
II.1.2. Das Gesamtmolekül. Notwendigkeit und Vorschlag einer erweiterten Nomenklatur.

Bei den bisherigen Symmetrieüberlegungen blieb ein Moment unberücksichtigt. Die Verknüpfung der äußeren Ringe kann sowohl im Uhrzeigersinn als auch im Gegenuhrzeigersinn erfolgen, wobei die Chiralität der äußeren Ringe wesentlichen Einfluß zeigen kann.

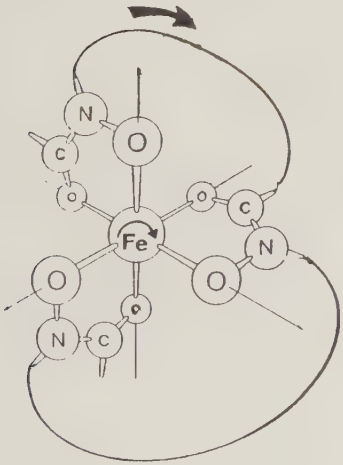
Vergleicht man natürliches Ferrichrom mit synthetischem, aus D-Ornithin hergestelltem Enantioferrichrom (67), so ist bei dem Enantiomeren die Δ -cis-Anordnung im Gegensatz zur Λ -cis-Konfiguration bei der natürlichen Verbindung zu finden. Die drei hintereinander verknüpften Ornithin-Aminosäuren erzwingen offensichtlich nicht nur die Konformation des Peptidrings (vermutlich β-turn) (68-7o), sondern auch die "optische" Anordnung für die komplexierenden Reste: 3x(L-Ornithin) erzwingt Λ am Fe - O - Oktaeder, 3x(D-Ornithin)



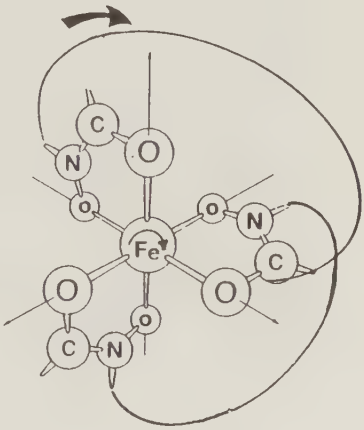
Λ-λ-C-cis, cis



Λ-λ-N-cis, cis



Λ-δ-C-cis, cis



Λ-δ-N-cis, cis

Abb. 5: Illustration zum Vorschlag einer erweiterten Nomenklatur. Es sind nur 4 der möglichen 32 Isomere abgebildet.

bewirkt Δ.

Anders sieht die Situation bei Enterobactin aus. Als Gerüst dient hier ein esterverknüpfter Ring aus 3x(L-Serin). Das Eisen jedoch ist Δ -koordiniert (153). Synthetisches Enantioenterobactin aus D-Serin verursacht Λ (154). Die Beispiele zeigen, daß die Anordnung im äußeren Ringsystem gerade für die Koordination des Eisenzentrums von Bedeutung ist. Zwar wurde in den gerade beschriebenen Fällen von einem Peptidringsystem ausgegangen, das nicht ohne weiteres auf andere Siderophore übertragen werden darf; das zugrunde liegende Prinzip jedoch, daß das äußere Ringsystem die optische Komplexierung am Eisen beeinflußt - gleichgültig, um welchen Verknüpfungstyp es sich handelt (s. nächster Abschnitt) - muß durch eine erweiterte Nomenklatur berücksichtigt werden. Die Unterscheidung mit Hilfe der Bezeichnung "Enantio" ist absolut nicht ausreichend.

In Anlehnung an die Leong-Raymond'sche Nomenklatur schlage ich für die 2 möglichen äußeren Ringverknüpfungen im und gegen den Uhrzeigersinn vorläufig die zwei griechischen Buchstaben λ und δ vor. Insgesamt sind somit 32 Isomeren möglich und zwar jeweils 8 der Reihen Λ, λ ; Λ, δ ; Δ, λ ; Δ, δ . Abb.5 zeigt exemplarisch einige der Isomeren.

Insgesamt wird es schwierig sein, die Existenz solcher Isomeren nachzuweisen. Möglicherweise können zusätzliche Informationen gewonnen werden, wenn chirale Chromophore der Ringverknüpfungen untersucht werden. Die hier angebotene Nomenklatur weist leider den selben Makel, wie die von Leong und Raymond auf: sie ist nicht allgemein, sondern verbindungsspezifisch.

II.1.3. Systematik einkerniger Fe - Trihydroxamatkomplexe. Trans-Isomere bei Coprogen?

Im Fall einkerniger, natürlicher Trihydroxamatkomplexe lassen sich drei Typen von äußerer Ringverknüpfung beobachten (s. Abb.6):

1.) Ferrichrom-Typ. Von einem Cyclohexapeptid gehen drei Ornithinreste zur Komplexierung des Eisens ab.

2.) Fusigen-Typ. Die 3 ornithinartigen Aminosäuren sind mit den Isopentenolresten der jeweils nächsten Ornithingruppe über die Isopentenolreste als Ester verbunden. Dies bedeutet, daß die 3 äußeren Ringe je 2 Hydroxamatgruppen verknüpfen, und zwar vom N-Atom der ersten Hydroxamatgruppe zum C-Atom der zweiten Gruppe.

3.) Coprogen. Die Hydroxamatgruppen sind durch lediglich 2 äußere Ringe miteinander verbunden. Zwei Ornithingruppen bilden durch eine Dipeptidbindung einen Diketopiperazinring. Die Ringverknüpfung ist N - N'. Eine dritte Aminosäure des Ornithintyps ist wie bei Fusigen durch Ester mit einem der Isopentenolreste des N-N'-Dipeptids verbrückt.

Die Ferrioxamine bilden wie Coprogen ebenfalls nur 2 äußere Ringverknüpfungen aus C-N', C'-N''. Im Gegensatz zu den Siderophoren des Ferrichrom- und des Fusigentyps, die auch im nicht eisenbindenden Zustand eine Ringstruktur aufweisen, bilden Coprogen und Ferrioxamine im eisenfreien Zustand lineare Ketten aus.

Die chemische Struktur der äußeren Ringe beeinflußt sowohl die cis/trans-Isomerie als auch die optische Λ , Δ -Isomerie am Fe-O-Oktaeder. Wie im vorangegangenen Abschnitt dargelegt, wird in der Ferrichromreihe die Λ -Konformation des Eisenzentrums durch den β-turn im Peptidteil erzwungen. Bei Verbindungen des Fusigentyps, wie Triacetylfusarinin, ist die optische Anordnung des Fe-O-Oktaeders hingegen lösungsmittelabhängig (63). Die Esterverknüpfungen scheinen den Einfluß der Ornithingruppen auf die Chiralität am Eisenzentrum zu verringern. Ferrioxamin E zeigt optisches Racemat (155), die Anordnung für Coprogen wird in dieser Arbeit

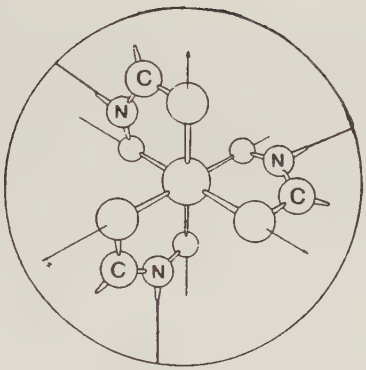
untersucht.

Auch die Problematik der cis/trans-Isomerie kann nicht bei allen 3 Siderophorklassen einheitlich beantwortet werden. Bei Siderophoren der Ferrichromreihe und des Fusigentyps wurden im festen (68-7o,72,73,8o) und in wenigen untersuchten Fällen auch im gelösten Zustand (65) nur eine cis-Anordnung gefunden. Die cis-Konfiguration ist in diesen Fällen durch die selbst im eisenfreien Zustand relativ geringe Flexibilität des Gerüstrings bedingt. Bei Eisenkomplexierung verhindert die Ringstruktur offensichtlich die trans-Anordnung, wegen den dabei notwendigerweise auftretenden Spannungen.

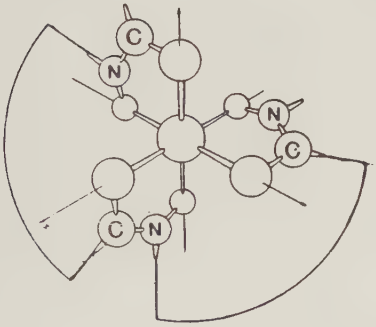
Im Fall von Ferrioxamin und Coprogen sollte man jedoch nicht zwangsläufig cis-Isomerie erwarten. Die Moleküle besitzen ja im nicht eisenbindenden Zustand wegen ihrer Linearität eine bei weitem größere Flexibilität als die Siderophore der Ferrichromreihe und des Fusigentyps. In der Tat konnten bei Ferrioxamin B in Lösung cis- und trans-Isomeren im Verhältnis 65:35 nachgewiesen werden (149).

Aus den für Ferrioxamin genannten Gründen sollte auch für Coprogen die Möglichkeit einer cis/trans-Isomerie in Erwägung gezogen werden. Aussagen darüber sind im Prinzip aus der Mößbauerspektroskopie gewinnbar. Auf der Basis von Punktladungsmodellen (15o,151) können aus einem Vergleich der Asymmetrieparameter η von reiner Verbindung und gefrorener Lösung Informationen über die cis/trans-Isomerie in Lösung erhalten werden. Wegen der Komplexität der Spektren und der außerordentlich starken Spin-Spin-Relaxation der unverdünnten Proben selbst bei 4,5 K war ein Vergleich leider unmöglich. Ansonsten sind Aussagen über eine cis/trans-Isomerie von Fe^{3+}-Komplexen nur für den festen Zustand, z.B. aufgrund von Röntgenstrukturanalysen oder IR- und Ramanspektren möglich. In Lösung tritt jedoch ein prinzipielles Problem auf: In der high spin d^5-Elektronenkonfiguration sind Eisenkomplexe wegen der fehlenden Kristallfeldstabilisierungsenergie kinetisch labil. Bei Ferrichrom beträgt die Halbwertszeit für den $^{59}Fe^{3+}$-Austausch bei pH 6,3 ~1o Minuten (152). Des-

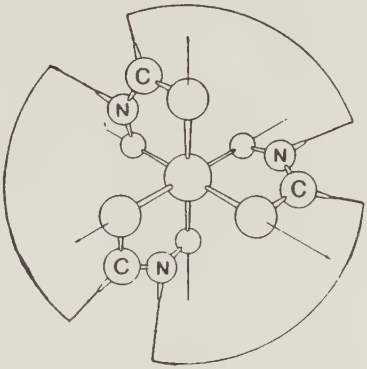
1. Ferrichrom-Typ



3a. Coprogen



2. Fusigen-Typ



3b. Ferrioxamin B

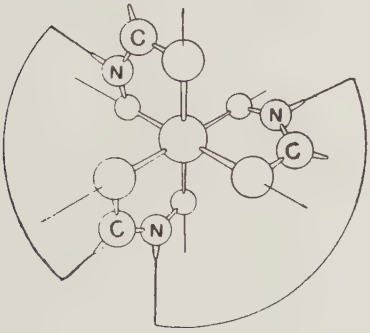


Abb. 6: Anhand der Modelle 1. bis 3. lassen sich die unterschiedlichen Formen der Hydroxamat-Verbrückungen verdeutlichen.

wegen wurde die Trennung von Isomeren in Lösung bisher nur erfolgreich mit Eisensubstitution durch Chrom erreicht, da bei Cr^{3+} die große Ligandenfeldstabilisierungsenergie Isomerisierungen während der Isolation verhindert. (Halbwertszeiten von mehreren Tagen in Lösung). Eine tiefere Beschäftigung mit dieser Frage hätte den Rahmen der vorliegenden Arbeit gesprengt und konnte deshalb leider nicht weiter verfolgt werden.

II.2. DIE MÖSSBAUERPARAMETER

Der Atomkern kann mit elektrischen und magnetischen Feldern in Wechselwirkung treten. Der zugehörige Hamiltonoperator enthält Terme, die verschiedene Wechselwirkungen darstellen und von der jeweiligen Multipolarität sowohl der Kernmomente als auch der mit diesen Momenten in Wechselwirkung tretenden Felder.

$$\hat{H} = \hat{H}(e0) + \hat{H}(m1) + \hat{H}(e2) + \hat{H}(z) + \hat{H}(KF) \qquad (1)$$

Der erste Term beschreibt die Coulombwechselwirkung zwischen dem Kern und der Elektronendichte am Kernort. Diese Monopolwechselwirkung wirkt auf die Kernenergieniveaus, ohne deren Entartung zu verändern. Sie gibt die Positionen der Resonanzlinien bzw. den Schwerpunkt des Spektrums auf der Geschwindigkeits(=Energie-)skala an und bestimmt die Isomerieverschiebung δ. Der zweite Term ist der Kopplung zwischen dem magnetischen Dipolmoment des Kerns ($I > 1/2$) und einem effektiven magnetischen Feld am Kernort zuzuschreiben. Der dritte Term drückt die elektrische Quadrupolwechselwirkung aus. Die zweite und dritte Wechselwirkung spalten das Kernenergieniveau in Subniveaus auf, ohne den Schwerpunkt des Multipletts zu verschieben. Höhere Wechselwirkungen können vernachlässigt werden, weil ihre Energien um mehrere Größenordnungen kleiner sind. Elektrische Dipolwechselwirkung ist paritätsverboten.

Die Eigenzustände eines Ions sind im allgemeinen gemischte Kern-und Elektronenzustände. Sie werden somit auch durch die elektrische und magnetische Wechselwirkung der Elektronenhülle mit der Umgebung bestimmt. Diesem Sachverhalt wird durch die letzten 2 Terme Rechnung getragen. $\hat{H}(z)$ ist die Zeeman-Wechselwirkung des Elektronenspins mit einem angelegten äußeren Magnetfeld. $\hat{H}(Kr)$ beschreibt die Aufspaltung der Elektronenniveaus durch die Einwirkung eines Kristallfeldes. Die Zahl und Abstände der Linien eines Mößbauerspektrums werden weitgehend von der Aufspaltung der Elektronenzustände durch das Kristallfeld bestimmt. Sie sind gegeben durch die Symmetrie des Kristallfeldes, die relative und

absolute Größe der Kristallfeld-Aufspaltungsparameter, den Entartungsgrad, die Besetzung der Elektronenzustände und schließlich durch den Kernspin im Grund- und angeregten Zustand. Die Aufspaltungsbilder können äußerst verschiedenartig sein und eine Vielzahl von Linien enthalten. Es ist nicht möglich ein allgemeingültiges Schema aufzuzeichnen. Ein Überblick über die wichtigsten Erscheinungsformen wird teilweise in den folgenden Kapiteln gegeben, ansonsten sei auf die Literatur verwiesen (156-163).

Da eine vollständige theoretische Behandlung im allgemeinen äußerst kompliziert und zeitraubend ist, wurde primär für die ESR-Spektroskopie eine Methode entwickelt, die mit einem effektiven Spin $\vec{S}'$ arbeitet, der ein fiktives Drehmoment hat. Der effektive Spin ist definiert: $N = 2S'+1$, wobei N die Anzahl der elektronischen Zustände bedeutet. Im Falle der Aufspaltung des ^6S-Zustands von Fe^{3+} z.B. in 3 Kramers-Dubletts, würde also jedes Dublett für sich mit einem effektiven Spin $\vec{S}'=1/2$ behandelt werden können.

In einigen Fällen kann der effektive Spinhamiltonoperator theoretisch behandelt werden. In den meisten anderen Fällen ist es üblich, die Wellenfunktionen in Termen einiger weniger Kopplungskonstanten, die bei der Beschreibung der gemischten Kern-und Elektronenzustände auftreten, zu parametrisieren. Rechnerisch versucht man dann, diese Parameter an die experimentellen Daten anzupassen. Ohne Berücksichtigung der Isomerieverschiebung, die ja keine Aufspaltung verursacht, kann der Spinhamiltonoperator mit einem effektiven Spin $\vec{S}'$ und dem Kernspin $\vec{I}$ folgendermaßen geschrieben werden

$$\hat{H} = \hat{\vec{S}}' \cdot \underline{\underline{D}} \cdot \hat{\vec{S}}' + \beta_e \vec{H} \cdot \underline{\underline{g}} \cdot \hat{\vec{S}}' + \hat{\vec{I}} \cdot \underline{\underline{A}} \cdot \hat{\vec{S}}' + \hat{\vec{I}} \cdot \underline{\underline{P}} \cdot \hat{\vec{I}} - g_N \beta_N \vec{H} \cdot \hat{\vec{I}} \quad (2)$$

Die Tensoren $\underline{\underline{A}}$, $\underline{\underline{g}}$, $\underline{\underline{P}}$ und $\underline{\underline{D}}$ können mit Kenntnis der Elektronenwellenfunktionen, oder gleichwertig, der Kristallfelder und der Spin-Bahnkopplung, die auf die Elektronen wirkt, berechnet werden. In den folgenden Abschnitten werden die einzelnen Parameter und die Isomerieverschiebung genauer beschrieben.

II.2.1. Isomerieverschiebung

Unter elektrischer Monopolwechselwirkung wird die elektrostatische Coulomb-Wechselwirkung zwischen der Kernladung, die über ein bestimmtes Volumen verschmiert ist, und den Elektronen im Kernbereich verstanden. s-Elektronen besitzen die Fähigkeit, sich eine gewisse Zeit am Kernort aufzuhalten. Die Aufenthaltswahrscheinlichkeit am Kern von Elektronen mit nicht verschwindendem Bahnmoment, also p-, d- und f-Elektronen ist 0, solange relativistische Effekte unberücksichtigt bleiben. Berücksichtigt man diese, haben auch $p_{1/2}$-Elektronen eine sehr kleine Aufenthaltswahrscheinlichkeit am Kernort.
Die elektronische Ladungsdichte am Kern $-e\,|\psi(0)|^2$ verursacht eine Energieverschiebung der Kernniveaus in Abhängigkeit vom Kernradius. Da sich die Kerngröße während des Zerfalls ändert resultiert eine Verschiebung der Energie des Kernübergangs, die folgendermaßen beschrieben werden kann:

$$\delta E = 2\pi/3\, Ze^2 |\Psi(0)|^2 (\langle r_a^2\rangle - \langle r_g^2\rangle) \qquad (3)$$

Z ist die Ordnungszahl des Mößbaueratoms, $\langle r_a^2\rangle$ und $\langle r_g^2\rangle$ sind die Erwartungswerte des Quadrats des Kernradius im angeregten bzw. Grundzustand. Wenn die Mößbaueratome der Quelle und des Absorbers sich in unterschiedlichen chemischen Umgebungen befinden verschiebt sich die Mößbauerlinie um folgenden Betrag:

$$\delta E = 2\pi/3\, Ze^2 (|\Psi_A(0)|^2 - |\Psi_Q(0)|^2)(\langle r_a^2\rangle - \langle r_g^2\rangle) \qquad (4)$$

Die Indizes "A" und "Q" stehen für Absorber und Quelle.
Die Isomerieverschiebung δ ist der Differenz der elektronischen Ladungsdichten zwischen Quellen- und Absorberkernen. Die Isomerieverschiebung eines Absorbers wird im allgemeinen relativ zu einem Standardmaterial angegeben, z.B. metallisches α-Eisen. Umrechnungstabellen für Quellen-und Referenzmaterial sind bei Shenoy (61) zu finden.

Folgende Vereinfachung kann noch vorgenommen werden. Setzt man $r_A - r_G = \delta R$ und $r_A + r_G = 2R$ gilt:

$$\langle r_A^2 \rangle - \langle r_G^2 \rangle = 2(\delta R/R)R^2 \qquad (5)$$

Im Falle von Eisen wurden folgende Werte ermittelt (164, 165):

$(\delta R/R) = -16{,}0;\ -21{,}2;\ -20{,}4;\ -18{,}2$

Positive Isomerieverschiebung bedeutet damit ein Absinken der Elektronendichte am Kern.

Änderungen der Gesamtelektronendichte in der Valenzschale z.B. durch Ligandenvariation oder Redoxvorgänge beeinflussen die Elektronendichte am Kern in zweierlei Weise. Direkte Veränderungen der s-Elektronenpopulation in der Valenzschale bewirken direkte Änderungen von $|\varphi_A(o)|^2$. Eine Erhöhung der s-Elektronendichte bedeutet also eine Erniedrigung der Isomerieverschiebung.

Indirekt kann die s-Elektronendichte am Kern durch Abschirmung von s-Elektronen durch p-,d-und f-Elektronen und einer damit verbundenen Ausdehnung der s-Elektronenwolke erfolgen. Die elektrostatische Abstoßung zwischen den Elektronen (Konfigurationswechselwirkung) verursacht Energiedifferenzen bei Elektronen der selben Schale, was Unterschiede der Radialwellenfunktionen und damit ihrer Radialverteilung $\langle r^{-3} \rangle$ bewirkt. Die elektrostatische Abstoßung bedingt (über das Ausschlußprinzip) eine Austauschwechselwirkung zwischen der Valenz und den gefüllten Rumpf(core)-Schalen. Wenn der Nettospin S für Elektronen in der Valenzschale "up" ist, dann werden die "up"-Elektronen der geschlossenen Schalen eine etwas andere Energie Haben als die mit "down" und mithin leicht unterschiedliche Werte von $\langle r^{-3} \rangle$ (core Polarisation)

In Fällen, in denen keine Valenz-s-Elektronen auftreten, wie z.B. in Fe^{3+} high spin, können sich Veränderungen der d-Elektronendichte der Valenzschale über die Austauschwechselwirkung(core-Polarisation) wie schon beschrieben zwischen 3d und den core-s-Elektronen auswirken. Mit zunehmender 3d Elektronendichte nimmt über die core-Polarisation die Gesamtspindichte am Kernort ab und damit die Isomerieverschiebung zu(166).

11.2.2. Quadrupolaufspaltung (P).

Eine Punktladung q in einer Entfernung $r = \sqrt{(x^2 + y^2 + z^2)}$ kann ein Potential $V(r) = q/r$ am Kern verursachen. Das elektrische Feld E am Kern ist der negative Gradient des Potentials, $-\vec{\nabla}V$, und der elektrische Feldgradient EFG die 2. Ableitung des Potentials $-\vec{\nabla}\vec{\nabla}V$. Der EFG-Tensor gibt keine vollständige Beschreibung der Ladungsverteilung um den Kern. Er enthält lediglich Terme, die die Winkelabhängigkeit der Energie des Kernquadrupolmoments bestimmen (167). Der EFG-Tensor lautet:

$$EFG = \vec{\nabla}\vec{E} = -\vec{\nabla}\vec{\nabla}V = \begin{bmatrix} V_{xx} & V_{xy} & V_{xz} \\ V_{yx} & V_{yy} & V_{yz} \\ V_{zx} & V_{zy} & V_{zz} \end{bmatrix} \qquad (6)$$

Wegen der symmetrischen Form des Tensors sind nur 5 Komponenten voneinander unabhängig ($V_{ij} = V_{ji}$). Durch Wahl eines geeigneten Achsensystems - Hauptachsen genannt - können die Nebendiagonalelemente eliminiert werden. Außerdem muß aufgrund der Laplace Gleichung der EFG ein Tensor mit der Spur o sein, also:

$$\nabla^2 V = V_{xx} + V_{yy} + V_{zz} = o \qquad (7)$$

Wählt man nun die Hauptachsen so, daß folgende Reihenfolge gilt:

$$|V_{zz}| \geq |V_{xx}| \geq |V_{yy}|$$

kann der EFG durch 2 unabhängige Parameter ausgedrückt werden, die da sind 1. V_{zz}, manchmal auch eq genannt(e ist hier die Protonenladung) 2. Asymmetrieparameter η :

$$\eta = \frac{V_{xx} - V_{yy}}{V_{zz}} \qquad (8)$$

Im Hauptachsensystem gilt für die Symmetrien C_4 bzw.C_3 wegen $V_{xx} = V_{yy}$: $\eta = o$, d.h. der EFG ist axialsymmetrisch.

Es existieren grundsätzlich 2 Quellen für den EFG:

1. $(V_{zz})_L$ reflektiert die Molekülsymmetrie. Nicht kubisch verteilte Ladungen bei Atomen und/oder Liganden in direkter Umgebung des Mößbauerkerns bewirken diesen EFG-Anteil. Vorhersagen über die relative Größe und das Vorzeichen von $(V_{zz})_L$ können unter Verwendung eines einfachen Punktladungsformalismus gewonnen werden (15o,151). Ein kleiner MO-Anteil mischt mit, ist jedoch selbst durch umfangreiche MO-Rechnungen nur mit geringer Genauigkeit bestimmbar. Da ferner die Elektronenschale eines Mößbaueratoms durch diese elektrostatische Wechselwirkung mit der nichtkubischen Ladungsverteilung des umgebenden Kristallgitters verzerrt wird, muß $(V_{zz})_L$ mit dem Sternheimer "antishielding"-Faktor multipliziert werden, der $(V_{zz})_L$ bei Eisenverbindungen etwa um den Faktor 1o verstärkt.
2. $(V_{zz})_{Val}$ ist Folge einer nichtkubischen Elektronenverteilung in den Valenzorbitalen (asphärische Ladungsverteilung). Dieser Anteil zerfällt in 2 Komponenten, $(V_{zz})_{KF}$ und $(V_{zz})_{MO}$. $(V_{zz})_{KF}$ wird durch eine asphärische Besetzung von d-Orbitalen aufgrund der Kristallfeldaufspaltung erzeugt. $(V_{zz})_{MO}$ beschreibt ansiotrope Bindungseigenschaften, also eine anisotrope Besetzung der MO's. Da die Valenzelektronen vom Kern durch die Rumpfelektronen abgeschirmt werden, muß $(V_{zz})_{Val}$ mit dem Sternheimer-"shielding"-Faktor multipliziert werden, der für Eisen zwischen o,25 und o,35 liegt (158,161).

Vollständig lautet V_{zz} dann:

$$V_{zz} = (1 - \gamma)(V_{zz})_L + (1 - R)[(V_{zz})_{KF} + (V_{zz})_{MO}] \qquad (9)$$

Eine quantitative Auftrennung von V_{zz} in die einzelnen Beiträge ist recht schwierig. Für $(V_{zz})_{KF}$ können jedoch folgende Faustregeln gegeben werden. Der Beitrag ist o in oktaedrischen Komplexen mit voller oder halbvoller t_{2g}- und e_g-Subschale, also Fe(II)-low spin und Fe(III)-high spin. In Verbindungen mit Fe(II)-high spin und Fe(II)-low spin ist dieser Anteil jedoch wichtig.

Die Wechselwirkung zwischen einem Kern mit dem Quadrupolmoment eQ und einem Feldgradienten an diesem Kern mit der z-Achse als Quantisierungsachse, kann durch folgenden Hamiltonoperator ausgedrückt werden (exakt nur für I= 3/2, was für den angeregten Eisenkern zutrifft):

$$\hat{H}_Q = \frac{e\,Q\,V_{zz}}{4I(2I-1)} \left| 3\hat{I}_z - \hat{I}^2 + \frac{\eta}{2}\left(\hat{I}_+^2 + \hat{I}_-^2\right)\right|, \quad P = \frac{eQV_{zz}}{4I(2I-1)} \qquad (10)$$

I ist die Quantenzahl des Kernspins. $\hat{I}_{\pm} = \hat{I}_x + i\hat{I}_y$ sind Verschiebeoperatoren, die Nebendiagonalelemente in der Hamiltonmatrix bewirken. $\hat{I}_x$, $\hat{I}_y$, $\hat{I}_z$ sind die Operatoren der Kernspinprojektionen auf die Hauptachsen.

Die Berechnung der Störmatrix in erster Ordnung ergibt den Eigenwert E_Q des Störoperators H_Q:

$$E_Q = P\cdot\left|3m_I^2 - I(I+1)\right|\cdot\sqrt{1+\eta^2/3} \qquad (11)$$

wobei $m_I = I, \ldots -I$ die magnetische Spinquantenzahl des Kerns ist. Die Subzustände werden durch den Betrag der magnetischen Quantenzahl $|m_I|$ bestimmt. Da m_I nur quadratisch auftaucht, bleiben die Unterzustände $|I, \pm m_I\rangle$, die von der Quadrupolaufspaltung herrühren, doppelt entartet. Die Entartung kann durch ein inneres oder angelegtes Magnetfeld (magnetische Dipolwechselwirkung) aufgehoben werden.

II.2.3. Der Einfluß des Kristallfeldes

II.2.3.1. Die Nullfeld(Kristallfeld)-Aufspaltung von S - Ionen.

Der Grundzustand für die $3d^5$-Konfiguration ist ^6S. Da L=o ist, sollte im ^6S-Term keine Spin-Bahnkopplung auftreten und mithin keine Kristallfeldaufspaltung. Auch die Einwirkung eines oktaedrischen Ligandenfeldes oder eines Feldes niedrigerer Symmetrie verursacht keine Aufspaltung, der Grundzustand bleibt 6-fach entartet. Nur durch eine Wechselwirkung des Grundzustandes mit angeregten Zuständen wird eine Kristallfeldaufspaltung des Grundzustandes ermöglicht.

Nach dem Russell-Saunders Kopplungsschema gelten für nicht verschwindende Matrixelemente folgende Auswahlregeln: $L = o, \pm 1$; $S = o, \pm 1$; $J = o$; $M_J = o$. Aufgrund der Auswahlregel für das Bahnmoment sollten Matrixelemente der Wechselwirkung mit anderen S- sowie P-Zuständen möglich sein. Da kein anderer S-Zustand existiert, ist nur folgende Wechselwirkung möglich (31):

$$\langle {}^6S_{5/2} | \hat{H}_s | {}^4P_{5/2} \rangle \qquad (12)$$

Insgesamt sind mehrere Mechanismen für die Kristallfeldaufspaltung von S-Zustand-Ionen durch Kopplung mit angeregten Zuständen vorgeschlagen worden (168-171), ein vollständiges Verständnis der Zusammenhänge steht allerdings noch aus.

II.2.3.2. Kramers'sche Entartung

Wenn man das Vorzeichen der Zeitkoordinate umkehrt, so ergibt sich ein wesentlicher Unterschied zwischen dem Verhalten von geladenen Teilchen in elektrischen und magnetischen Feldern. Ein elektrisches Feld hängt von den Positionen aller zu seiner Erzeugung beitragenden elektrischen Ladungen ab, aber nicht von deren Geschwindigkeit. Ein magnetisches Feld jedoch entsteht als Ergebnis von elektrischen Strömen. Kehrt man das Vorzeichen der Zeitkoordinate um, so wird auch die Richtung der Geschwindigkeit aller beteiligten elektrischen Ladungen umgekehrt und damit die Richtung des Magnetfeldes geändert. Grob ausgedrückt heißt das, daß ein magnetisches Feld weniger symmetrisch ist als ein elektrisches Feld (172).

Auf eine genauere Darlegung sei hier verzichtet und auf die Literatur verwiesen (160,172). Das Ergebnis der Kramers'schen Überlegungen lautet: Bei einem System mit ungerader Elektronenzahl ist jedes Energieniveau mindestens 2fach entartet. Die Ordnung der Entartung ist gerade, vorausgesetzt, daß kein magnetisches Feld vorhanden ist. Diese Kramers'sche Entartung existiert nicht für Systeme mit gerader Elektronenzahl und sie verschwindet in Anwesenheit eines äußeren magnetischen Feldes, da das System

dann keine Zeitumkehrsymmetrie besitzt. Im Fall von Fe(III) bedeutet dies, daß elektrische Felder - z.B. das Kristallfeld - die Entartung des ^6S-Zustandes nicht vollständig aufheben, sondern höchstens ein System von 3 Kramers-Dubletts erzeugen können.

II.2.3.3. Die Kristallfeldparameter.

In diesem Abschnitt soll die Ableitung der Kristallfeldparameter nach Al'tshuler (173) skizziert werden, um eine Grundlage für die im folgenden Abschnitt geübte Kritik zu haben. Eine andere gruppentheoretische Behandlung des Problems ist bei Weißbluth (31) zu finden.

Die Kristallfeldenergie kann in folgender Weise dargestellt werden:

$$H_{Kr} = \sum_i - e\, V(x_i, y_i, z_i) \qquad (13)$$

V ist das Potential des Kristallfeldes. x_i, y_i, z_i sind die Koordinaten des i-ten Elektrons in der Valenzschale. Wenn man eine Überlappung zwischen dem paramagnetischen Ion und seiner Umgebung ausschließt und das Potential V die Laplace-Gleichung erfüllt, kann das Potential als Reihenentwicklung von Kugelwellenfunktionen dargestellt werden.

$$V = \sum_{n,m} A_n^m\, r^n\, Y_n^m(\theta, \varphi) \qquad (14)$$

Es können folgende Vereinfachungen vorgenommen werden:

- Bei d-Elektronen ergeben alle Kugelwellenfunktionen mit $n > 4$ Matrixelemente, die o sind.
- Matrixelemente ungerader Ordnung sind o, da die Elektronenwellenfunktionen unter Inversion invariant sind.
- Terme mit n=o ergeben vernachlässigbare additive Konstanten.
- Da V reell ist, gilt: $A_n^m = (A_n^{-m})^*$

Weitere Vereinfachungen können unter Berücksichtigung der Kristallfeldsymmetrie gewonnen werden. Die Kugelwellenfunktion $Y_n^m(\theta, \varphi)$ reflektiert mit:

m = o Axialsymmetrie ; m = ± 2 rhombische Symmetrie
m = ± 3 trigonale Symmetrie ; m = ± 4 tetragonale Symmetrie
m = ± 6 hexagonale Symmetrie.

Durch die Notation $A_n^o r^n Y_n^o(\theta,\varphi) = U_n^o$ sowie

$\{A_n^m Y_n^m(\theta,\varphi) + A_n^{-m} Y_n^{-m}(\theta,\varphi)\} = U_n^m$ läßt sich schreiben:

$$V_{Triklin} = \sum_{m=o}^{2} U_2^m + \sum_{m=o}^{2} U_4^m + \sum_{m=o}^{2} U_6^m \qquad (15)$$

$$V_{Rhombisch} = U_2^o + U_2^2 + U_4^o + U_4^2 + U_4^4 + U_6^o + U_6^2 + U_6^4 + U_6^6 \qquad (16)$$

$$V_{Hexagonal} = U_2^o + U_4^o + U_6^o + U_6^6 \qquad (17)$$

$$V_{trigonal} = U_2^o + U_4^o + U_4^3 + U_6^o + U_6^3 + U_6^6 \qquad (18)$$

$$V_{tetragonal} = U_2^o + U_4^o + U_4^4 + U_6^o + U_6^4 \qquad (19)$$

Eine Umformung in kartesische Koordinaten ergibt Parameter B_n^m mit homologen Polynomen V_n^m der Ordnung n.

$$U_n^m = B_n^m V_n^m \qquad (2o)$$

Da bei der Wirkung des Kristallfeldpotentials auf die Elektronenwellenfunktionen nicht der Radialanteil, sondern nur der Drehimpuls und seine Projektionen auf die z-Achse berücksichtigt werden muß, brauchen die Elektronenwellenfunktionen nicht explizit angegeben zu werden. Bei der Berechnung der Störmatrixelemente

$$\langle J\ M | \Sigma V_n^m | J\ M' \rangle \equiv \int \phi_M^* \Sigma V_n^m \phi_{M'} d\tau \qquad (21)$$

verschwinden diejenigen Elemente, bei denen $M \neq m + M'$ ist.

Um nun die nicht verschwindenden Matrixelemente von Zuständen mit gleichem J zu ermitteln, wird gewöhnlich die Methode äquivalenter Operatoren benutzt (174). Der Funktionensatz Y_n^m (m= o,±1, ±2..±n) bildet die Basis für eine irreduzible Darstellung einer Rotationsgruppe der Dimension 2n+1. Jede Funktion der Elektronenkoordinaten ΣV_n^m ist mit einem äquivalenten Operator verknüpft. Diese analogen Operatorfunktionen der Drehmomentprojektionen J_x, $\hat{J}_y$, $\hat{J}_z$ weisen die selben Transformationseigenschaften auf. Die Äquivalenzoperatoren der Polynome V_n^m sind tabelliert

(173). Die B_n^m werden im allgemeinen durch Parameter ausgedrückt, deren Werte aus der rechnerischen Anpassung des effektiven Spinhamiltonoperators an die experimentellen Daten gewonnen werden.

Die Hamiltonoperatoren des Kristallfeldterms lauten je nach Symmetrie im Falle des d-Ions Eisen:

$$\begin{aligned} \hat{H}_{Kub} &= B_4^0 \hat{V}_4^0 + 5\hat{V}_4^4 \\ &= a/6\left[\hat{S}_\xi^4 + \hat{S}_\eta^4 + \hat{S}_\zeta^4\right] \\ \hat{H}_{Trig} &= B_2^0\hat{V}_2^0 + \hat{H}_{Kub} + B_4^3\hat{V}_4^3 \end{aligned} \qquad (22)$$

Der letzte Term ist in den meisten Fällen vernachlässigbar. B_2^0 wird D gesetzt und man erhält:

$$\hat{H}_{Trig} = D\left[\hat{S}_z - 1/3S(S+1)\right] + \hat{H}_{Kub} \qquad (23)$$

$$\hat{H}_{Rhomb} = B_2^0\hat{V}_2^0 + B_2^2\hat{V}_2^2 + B_4^0\hat{V}_4^0 + B_4^2\hat{V}_4^2 + B_4^4\hat{V}_4^4$$

Die beiden letzten Terme werden vernachlässigt und B_2^2 ist gleich E :

$$\hat{H}_{Rhomb} = \hat{H}_{Trig} + E(\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2) + \hat{H}_{Kub} \qquad (24)$$

In den meisten ESR-und Mößbauerpublikationen wird der kubische Kristallfeldoperator im Falle axialer und rhombischer Symmetrie ebenfalls vernachlässigt (31,33,111,114). Oosterhuis et al.kritisierten dies(115,163) und erhielten zufriedenstellende Anpassungen sowohl der ESR- als auch der Mößbauerergebnisse nur unter Einbeziehung des kubischen Terms. Dieser Aspekt wird im folgenden Abschnitt diskutiert, weswegen er hier nicht weiter zu berücksichtigen ist.

Die Parameter E und D geben die Größe der Aufspaltung der 3 Kramers-Dubletts durch Einwirkung des Kristallfeldes über angeregte Zustände des Eisens wieder. Sie sind mit $\lambda = E/D$ und $0 \leq \lambda \leq 1$

so gewählt, daß im Hauptachsensystem $E < D$ ist. Im Falle trigonaler Symmetrie gilt $\lambda = 0$ und die 3 Kramers-Dubletts sind mit 2D und 4D aufgespalten (s.Abb. 7). Mit $\lambda = 0,\overline{3}$ bzw. $D = 3E$ ist die volle rhombische Verzerrung erreicht. λ nennt man deshalb auch Rhombizitätsparameter.

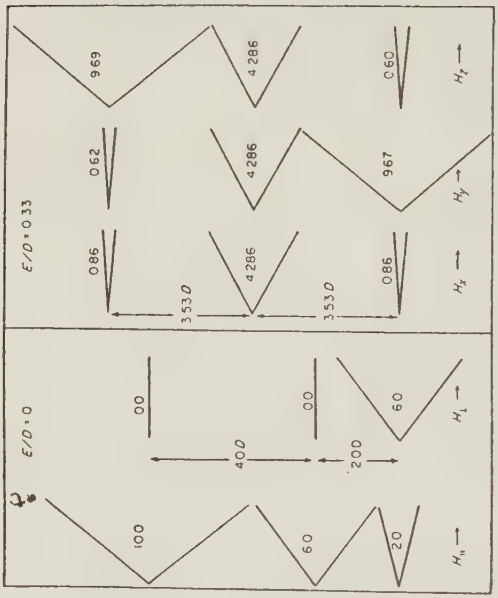
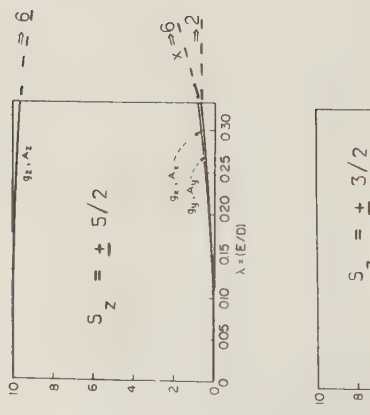


Abb. 7: Darstellung der Kramers-Dubletts in trigonaler und rhombischer Symmetrie. Die Zahlen geben die Zeeman-Aufspaltung der jeweiligen Dubletts, d.h. die effektiven g-Tensor-Komponenten wieder (nach (163))

Abb. 8: Effektive g,A-Werte. In diesen, von Wickman berechneten Diagrammen läßt sich die Abhängigkeit der effektiven g-und A-Tensoren vom Rhombizitätsparameter / im Intervall $0 \leq \lambda \leq 1/3$ verfolgen Von (156).



Bei voller Rhombizität sind die 3 Kramers-Dubletts symmetrisch mit 3,53 D aufgespalten. Werden die λ-Werte > 1/3, tritt wieder Konvergenz in Richtung trigonaler Symmetrie auf. Die Hauptverzerrung liegt nun allerdings auf einer anderen Achse. Deshalb wurde von Blumberg gefordert, daß λ auf $0 \leq \lambda \leq 1/3$ beschränkt wird (36). Durch Achsentransformationen (37, 115) kann dieses Problem gelöst werden. $\lambda = 1$ stellt wieder trigonale Symmetrie dar. Wie Griffith zeigt (34,35), muß allerdings die Wirkung der angeregten Quartett-Zustände nicht zwangsläufig die Symmetrie des Feldes widerspiegeln (s. auch nächster Abschnitt). Die gleiche Aufspaltung der 3 Kramers-Dubletts impliziert daher nicht notwendigerweise vollständige rhombische Symmetrie.

II.2.3.4. Kritik der literaturüblichen Verwendung des Kristallfeld-Hamiltonoperators.

Im vorherigen Kapitel wurde mit den Begriffen"rhombisch", "trigonal" etc. gearbeitet. Dies mag verwundern, da diese Bezeichnungen üblicherweise bei Raumgruppen Verwendung finden, und nicht bei Punktgruppen, um die es sich hier handelt. In der Tat ist diese Nomenklatur verwirrungsstiftend und in einigen Fällen falsch. Geht man von oktaedrischen Komplexen aus, kann die Symmetrie der Punktgruppe mit einem der kristallographischen Achsensysteme korreliert werden, solange es sich um Moleküle des Typs MA_6 dreht. Sobald aber gemischte Liganden vorliegen - und bei den hier untersuchten Siderophoren handelt es um unterschiedliche Sauerstoffliganden - sind die Begriffe"trigonal" etc. völlig fehl am Platze, da keine Eindeutigkeit mehr vorliegt.

Der Rhombizitätsparameter λ soll ein Abweichen der Symmetrie von "trigonal" nach "rhombisch" wiedergeben. Wie jedoch aus Tabelle 1 ersichtlich ist, fällt unter den Begriff "rhombisch" jegliche Symmetrie mit Drehachsen, die eine kleinere Ordnung als 3 aufweisen. λ reflektiert so-

mit ununterscheidbar 2 unterschiedliche Eigenschaften: 1. cis / trans-Isomerie und 2. Erniedrigung der Symmetrie des Achsensystems.

TABELLE 1

Korrelation der Punktgruppen mit den kristallographischen Achsensystemen.

	rhomboedrisch (trigonal) $a = b = c$ $\alpha = \beta = \gamma \neq 90^o$	hexagonal $a = b \neq c \neq a$ $\alpha = \beta = 90^o$, $\gamma = 120^o$	rhombisch $a \neq b \neq c \neq a$ $\alpha = \beta = \gamma = 90^o$
MA_6	D_{3d}	D_{2d}	D_{2h}
MA_3B_3 (cis)	C_{3v}	C_1	C_1
MA_3B_3 (trans)	C_{2v}	C_{2v}	C_{2v}

Oosterhuis hat demnach unrecht, wenn er "rhombisch" mit trans - Isomerie erklären möchte (159). Wie aus Röntgenstrukturuntersuchungen hervorgeht, haben die Siderophore im festen Zustand meist eine cis - Anordnung. λ sollte also in diesen Fällen ein niedriger symmetrisches Achsensystem indizieren. Wie der Tabelle zu entnehmen ist, zeigen MA_3B_3- cis - Isomere eine C_1- Symmetrie. Demnach sollte man eher einen "triklinen" Störterm in den Hamiltonoperator des Kristallfeldes einschieben als einen kubischen, wie Oosterhuis es fordert.

$$\hat{H}_{Trikl} = \hat{H}_{Trig} + B_2^1 \hat{V}_2^1 + \hat{H}_{Rhomb} \; (+ \hat{H}_{Kub}) \qquad (25)$$

Aus den Tabellen von (173) kann man entnehmen:

$$\hat{V}_2^1 = \alpha \bar{r}^{-2}/2 \left\{ \hat{S}_x \hat{S}_z + \hat{S}_z \hat{S}_x \right\} \qquad (26)$$

Die Aufstellung entsprechender Rechenprogramme war im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich. Deswegen wurde mit dem gängigen effektiven Spinhamiltonoperator gearbei-

tet.
Die guten Resultate, die Oosterhuis durch Einführung eines kubischen Kristallfeldterms erzielen konnte, dürften wohl auf den Umstand zurückzuführen sein, daß die komplexierenden Brenzkatechine das Eisen über 3 Di-Oxo-Anionen komplexieren und daher vom Typ MA_6 sind, was bei gleichem Achsensystem der höchst möglichen Symmetrie entspricht. Für die hier zu untersuchenden Verbindungen trifft dies mit Sicherheit nicht zu.

II.2.4. Zeeman - und Kristallfeldterm.

Der allgemeine Ausdruck eines Hamiltonoperators für elektronische Zeemanwechselwirkung lautet:

$$\hat{H}_Z = \mu_B \vec{H} \cdot \underline{\underline{g}} \cdot \hat{\vec{S}} \qquad (27)$$

wobei μ_B das Bohr'sche Magneton ist. Befindet sich das Fe^{3+}-Ion in einem Gitter nichtkubischer Symmetrie, sollte man eine Anisotropie des g-Tensors erwarten. Experimentell wird jedoch gefunden, daß diese Anisotropie vernachlässigbar ist.

$$\hat{H}_Z = g \mu_B \vec{H} \cdot \hat{\vec{S}} \qquad (28)$$

g entspricht in etwa dem Wert des freien Elektrons (2,oo23). Dies ist der ungestörte Fall, d.h. der ^6S-Term wird wegen fehlendem Kristallfeld nicht aufgespalten. Es gilt dann für die Zeemanaufspaltung bei $\Delta E_{KF} = o$:

$$\Delta E_Z = 2g \mu_B \vec{H} \cdot \hat{\vec{S}}$$

Ist $\Delta E_Z \gg \Delta E_{KF}$ sind in einer guten Näherung die elektronischen Eigenzustände Eigenzustände von $\hat{S}_Z$, wobei die z-Richtung die des angelegten Feldes H ist.

Wenn $\Delta E_Z \simeq \Delta E_{KF}$ ist, wird die Berechnung der Energieniveaus und Eigenzustände komplizierter. Selbst bei $\Delta E_Z \ll \Delta E_{KF}$ hat das angelegte Feld einen Einfluß auf die Eigenzustände, da es die Entartung der Kramers-Dubletts aufhebt. In diesem Fall betrachtet man gewöhnlich jedes Kramers-Dublett getrennt. Für jedes Dublett wird ein fiktiver effektiver Spinoperator $\hat{\vec{S}}'$ (S'=1/2) eingeführt. Für die Zeeman-Wechsel-

wirkung gilt dann:

$$\hat{H}_Z = \mu_B \vec{H} \cdot \underline{\underline{g}}' \cdot \hat{\vec{S}}' \qquad (29)$$

Der Tensor $\underline{\underline{g}}'$ ist im allgemeinen nicht isotrop, hat also Komponenten g'_x, g'_y, g'_z . Die Werte für g'_i sind von der Symmetrie des Kristallfeldes abhängig und gelten für jedes Dublett einzeln, wie aus den Wickmandiagrammen ersichtlich ist.

II.2.5. Hyperfeinwechselwirkung.

Das am Kern wirksame Magnetfeld H hat seinen Ursprung in einer ganzen Reihe von Feldanteilen:

a) Makroskopische Beiträge (äußeres Feld, entmagnetisierendes Feld, Lorentzfeld)
b) Dipolbeiträge benachbarter Ionen bei nichtkubischer Symmetrie
c) Beiträge durch nicht gequenchte Bahnmomente und ausgerichtete Spins von nur teilweise besetzten Elektronenschalen
d) Fermi-Kontakt-Wechselwirkung, verursacht durch Polarisation von Rumpfelektronen (core-Polarisation) durch Valenzelektronen, durch kovalent zugemischte Elektronen und durch Leitungselektronen mit s-Charakter.

Die Beiträge a) und b) sind gegenüber den letzten beiden Beiträgen im allgemeinen klein. Der letzte Beitrag dominiert bei den 3d-Übergangselementen. Allgemein kann man bei nicht verschwindendem Hüllenspin stets ein Magnetfeld am Kernort erwarten. Die starke core-Polarisation ergibt beim Eisen ein resultierendes Feld am Kernort von etwa -220 kOe pro Spin 1 .

Das effektive Gesamtfeld am Kernort ist eine Summe aus internem und externem Feld:

$$\vec{H}_{eff} = \vec{H}_{ext} + \vec{H}_{int} \qquad (31)$$

Das,die Hyperfein(=HF)-Wechselwirkung verursachende interne Feld hat, wie schon erwähnt mehrere Anteile:

$$\vec{H}_{int} = \vec{H}_{Dip} + \vec{H}_{Bahn} + \vec{H}_{Spin} + \vec{H}_{Kontakt} \qquad (32)$$

Auf die Skizierung des dipolaren, H_{Dip} , des Orbital-, H_{Bahn}, und des Spin-Feldbeitrags sei hier verzichtet. Der Bahn-Beitrag ist für Fe^{3+}-high spin vernachlässigbar, der dipolare Beitrag ist für die Erklärung von Relaxationsphänomenen von Bedeutung. Ohne den dipolaren Beitreg lautet der magnetische Hamiltonoperator in ausführlicher Schreibweise:

$$H_q = 2g_n\beta_n\beta_e \sum_{i=1}^{n} \frac{\hat{\vec{I}}\hat{\vec{l}}_i}{r_i^3} + \frac{3(\hat{\vec{I}}\hat{\vec{r}}_i)(\hat{\vec{s}}_i\hat{\vec{r}}_i) - \hat{\vec{I}}\hat{\vec{s}}_i}{r_i^3} + \frac{8}{3}\pi\,\delta(\hat{\vec{r}}_i)\,\hat{\vec{I}}\hat{\vec{s}}_i \qquad (33)$$

l_i und s_i sind die quantenmechanischen Operatoren, die auf die elektronischen Zustände i einwirken, während I auf die Wellenfunktion des Kerns wirkt.

11.2.5.1. Das Fermi - Kontaktfeld.

$\vec{H}_c$ definiert sich durch den Unterschied der s-Elektronendichte mit "spin up" und "spin down" am Kernort (38) :

$$\vec{H}_c \sigma \sum_{ns} \left\{ |\Phi_{ns}(o)\uparrow|^2 - |\Phi_{ns}(o)\downarrow|^2 \right\} \qquad (34)$$

n gibt an, um welche Elektronenschale es sich handelt.

Die Valenzelektronen können mit den Rumpf-s-Elektronen in Konfigurationswechselwirkung treten. Dadurch wird 1. das Volumen $\langle r^{-3} \rangle$, d.h. die Radialverteilung der core-Elektronen verändert und 2. ein Ungleichgewicht der Spinerwartungswerte der s-Elektronen mit "spin up" und "spin down" am Kern verursacht. Diese endliche Spindichte am Kern bewirkt die Möglichkeit einer HF-Anomalie im Fall von Fe^{3+} high spin, da wegen L=o und fehlender dipolarer Wechselwirkung keine Spindichte am Kern zu erwarten wäre. Die Kontaktfelder sind oft sehr groß (~600 kOe).

Rührt die Spindichte nur von s-Elektronen mit der Dichte $\rho(o)$ her, dann gilt nach Freeman (39,175) :

$$\vec{H}_c = 16\pi/8\mu_B\rho(o) \langle S_s \rangle$$

Rührt die Spindichte von p-oder d-Elektronen her, dann ist die gerade beschriebene Spinpolarisation der s-Schale zu berücksichtigen :

$$\vec{H}_c = 2\vec{H}_{core} \langle S_{p,d} \rangle + 2\vec{H}_{val} \langle S_{p,d} \rangle$$

$\langle S_{p,d} \rangle$ ist der effektive Spin der p- und d-Elektronen. Der erste Anteil berücksichtigt die Spinpolarisation der core-Elektronen, der 2. Anteil die Spinpolarisation der Valenzelektronen. Ist die z-Achse die Quantisierungsachse, kann nach Freeman (39,175) eine Interpolationsformel benutzt werden, basierend auf:

$$\vec{H}_c = 2\vec{H}_{core}\langle S_{p,d}\rangle_z + 2\vec{H}_{val}\langle S_{p,d}\rangle_z + 16\pi/3\,\mu_B\rho(o)\langle S_s\rangle_z$$

Die Interpolationsformeln lauten für Eisen:

$$\vec{H}_{core} = -\{12,6 + 1,15(q_{3d}-5)\} \quad \text{in Tesla}$$

$$\vec{H}_{val} = \frac{1}{2}\{15,3 - 3,o6(q_{3d}-5)\}\, q_{4s} \quad \text{Tesla}$$

Das Kontaktfeld sei exemplarisch für 4 Konfigurationen berechnet (s.Tabelle 2).

TABELLE 2

Der Zusammenhang zwischen Elektronenkonfiguration und der Größe des Kontaktfeldes.

	$3d^5 4s^1$	$3d^6 4s^1$	$3d^5 4s^{o,1}$	$3d^{5,5} 4s^{o,1}$
$\vec{H}_{core}$	-12,6	-13,75	-12,6	-13,18
$\vec{H}_{val}$	+ 7,65	+ 6,15	+ o,76	+ o,69
$\vec{H}_c$	- 4,95	- 7,63	-11,84	-12,49

II.2.5.2. Der Hyperfein-Kopplungsparameter A.

Die oben skizzierte detaillierte Betrachtungsweise des Hyperfeinfeldes erfordert umfangreiche MO-Berechnungen, die hier nicht zur Verfügung standen. Es wurde der die einzelnen Beiträge zusammenfassende Hyperfein-Wechselwirkungstensor $\underline{\underline{A}}$ benutzt. Mit dieser Methode gilt für die magnetische Wechselwirkung zwischen Kern und umgebenden Elektronen :

$$\hat{H}_m = \hat{\vec{S}} \cdot \underline{\underline{A}}_n \cdot \hat{\vec{I}} \qquad (35)$$

wobei $\underline{\underline{A}}_n$ (= $\underline{\underline{A}}_a$, $\underline{\underline{A}}_g$) für den angeregten und Grundzustand des Kerns steht.

Eine Berechnung des Mößbauerspektrums setzt die Kenntnis des Tensors $\underline{\underline{A}}$, der ja alle Einflüsse der Elektronenhülle und der Kristallfeldsymmetrie enthält, voraus, und gelingt in Fällen, in denen sich $\underline{\underline{A}}$ durch vereinfachende Annahmen in einer übersichtlichen Form darstellen läßt. Die Linienlagen ergeben sich durch die Übergänge von den Eigenwerten E_g der Hamiltonfunktion im Kerngrundzustand zu den Eigenwerten E_a des angeregten Kernzustandes.

Für das "reine" Fe^{3+}-Ion, d.h. im störungsfreien Fall, ist die Quantenzahl des gesamten Drehimpulses F = S + I eine "gute Quantenzahl". $\underline{\underline{A}}$ ist in diesem Falle isotrop und reduziert sich auf eine Konstante.

$$\hat{H}_m = A_n \hat{\vec{S}} \cdot \hat{\vec{I}} \qquad (36)$$

Damit ergibt sich für high-spin-Verbindungen (S=5/2) eine Aufspaltung wie sie in Abb.9 dargestellt ist, mit $M_F = 0, \pm 1$. Die 6 möglichen Übergänge ergeben dann ein Hyperfeinspektrum mit 6 Linien, das durch große, temperaturunabhängige Abstände charakterisiert ist (176). Die Vorraussetzungen für eine solche Art der Aufspaltung sind in Fällen kubischer Kristallfeldsymmetrie möglich. Da Feldstörungen jedoch schwer auszuschließen sind, wurden Messungen dieses Aufspaltungstyps bisher nicht bekannt.

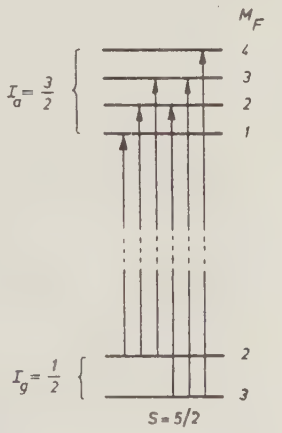


Abb.9: magnetische HF-Übergänge. Störungsfreier Fall

A_n kann im Mößbauerspektrum in Gegenwart eines starken angelegten Feldes ($\Delta E_Z \gg \Delta E_{KF}$) aus der maximalen magnetischen Hyperfeinaufspaltung gewonnen werden. In kleinen äußeren Feldern für die gilt $A_n \leq \Delta E_Z \ll \Delta E_{KF}$, werden die Kramers-Dubletts separat betrachtet. Die Hyperfeinwechselwirkung wird durch eine effektive Spinquantenzahl S' des jeweiligen Dubletts beschrieben.

$$\hat{H}_m = \hat{\vec{S}}' \cdot \underline{\underline{A}}' \cdot \hat{\vec{I}} \quad \text{mit} \quad \underline{\underline{A}}' = \frac{1}{2} A_n \, \underline{\underline{g}}' \tag{37}$$

$\underline{\underline{A}}$ ist also proportional g. Die Abhängigkeit von der Symmetrie des Kristallfeldes kann wie bei g für jedes Dublett aus den Wickman-Diagrammen (s.Abb.8) abgelesen werden.

II.2.6. Das Hyperfein-Spektrum. Berechnung des Spinhamiltonoperators.

In Kristallfeldern genügend niedriger Symmetrie spalten die Elektronenzustände in nur noch zweifach entartete Kramers-Dubletts auf. Die Abstände liegen in der Größenordnung von 10^{-4} eV, die Besetzungszahlen sind durch die Boltzmannverteilung bestimmt. Unter Verwendung des Kristallfeldoperators von Gl.(24) bei Vernachlässigung des kubischen Terms lautet der Spinhamiltonoperator:

$$\hat{H} = \underline{\underline{D}} \left\{ \hat{S}_z^2 - \frac{S}{3}(S+1) + \lambda (\hat{S}_x^2 - \hat{S}_y^2) \right\} + \beta \, \hat{\vec{S}} \cdot \underline{\underline{g}} \cdot \vec{H} \tag{38a}$$

$$+ \hat{\vec{I}} \cdot \underline{\underline{A}} \cdot \hat{\vec{S}} - \beta_n g_n \vec{H} \cdot \hat{\vec{I}} + eQV_{zz}/12 \left\{ \hat{I}_z^2 - \frac{5}{4} + \frac{\eta}{3}(\hat{I}_x^2 - \hat{I}_y^2) \right\} \tag{38b}$$

Elektronische Relaxationen sollen im folgenden unberücksichtigt bleiben. Ob der obige Hamiltonoperator in Anteile separierbar ist oder als Ganzes gelöst werden muß, ob die Berechnung für jedes einzelne Kramers-Dublett oder für ihre Gesamtheit vorzunehmen ist, hängt von der Größe des Elektronen-Zeeman-Terms relativ zu Kristallfeld- und Hyperfeinstrukturenergie ab. Es sind 3 Fälle unterscheidbar, die hier genauer untersucht werden sollen.

Übergänge zwischen Zuständen des Kerngrund- und angeregten Zustands, bei denen sich $\langle S_z \rangle$ ändert, erfordern Aufnahme oder Abgabe von Kristallfeldenergie. Da letztere etwa 10^{-4} eV beträgt, würden die zugehörigen Mößbauerlinien um den gleichen Betrag verschoben sein, d.h. man hätte eine "Isomerieverschiebung" von etwa 2000 mm/s. Spektren mit einer solch großen Verschiebung sind, selbst wenn sie eine hinreichende Intensität hätten, nicht mehr meßbar. In allen hier untersuchten Fällen erfolgen demnach die Übergänge vom Grund- zum angeregten Zustand des Kerns nur zwischen Kramers-Dubletts, für die gilt: $\langle S_z \rangle_g - \langle S_z \rangle_a = 0$

1. $\Delta E_Z \leq A_o \leq \Delta E_{kr}$

Die magnetische Hf-Wechselwirkung verursacht Aufspaltungen in der Größenordnung von 10^{-8} eV ($\sim 10^{-3}$ cm^{-1}). Das Anlegen kleiner Magnetfelder in der Größenordnung von 10 Oe bewirkt eine Zeeman-Aufspaltung der Elektronenzustände des Ions von etwa der gleichen Größe. Solche Felder haben einen starken Einfluß auf das Spektrum und sind schwierig zu vermeiden. Z.B. können die dipolaren Felder der Ligandenkerne leicht in dieser Größenordnung liegen. Die Kristallfeldaufspaltung ist in diesem Fall größer ($\sim 10^{-4}$ eV) als die übrigen Energiebeiträge in Gl.(38a + b). Jedes elektronische Dublett kann unter Verwendung eines effektiven Spins S'= 1/2 separat behandelt werden. Da ΔE_Z und A_o vergleichbar groß sind, kann Gl.38a nicht von Gl.38b separiert werden. Die Basiszustände müssen also sowohl elektronische als auch Kernanteile besitzen. Gl.(38a + b) wird für jedes Dublett n des Kerngrundzustands und des angeregten Zustands gelöst. Dann erfolgt die Berechnung der Energiedifferenzen und Übergangswahrscheinlichkeiten für jeden möglichen Übergang. Jedes der 3 Dubletts führt zu einem Mößbauerspektrum. Sie werden über Boltzmann nach $\exp(-\Delta E_{KF(n)}/kT)$ gewichtet. Bei Pulvern und Lösungen ist für $H \neq 0$ über alle Orientierungen der Kristallachsen relativ zu H und dem γ-Strahl zu integrieren.

Die Kristallfeldenergie ist eine Funktion von D und λ, während die Tensoren $\underline{\underline{g}}_n$ und $\underline{\underline{A}}_n$ Funktionen von λ allein sind. Unter Annahme alleiniger Fermikontaktwechselwirkung sind die korrespondierenden Komponenten von $\underline{\underline{g}}_n$ und $\underline{\underline{A}}_n$ gemäß Gl. (37) proportional.

2. $A_o \ll \Delta E_Z \ll \Delta E_{KF}$

Dieser Fall trifft schon bei angelegten Feldern von wenigen 1oo Oe zu. Die Zeeman-Wechselwirkung ist im Vergleich zur HF-Wechselwirkung groß und die elektronischen Eigenzustände sind durch ΔE_{KF} und ΔE_Z bestimmt. Abb. 1o gibt in etwa die Verhältnisse wieder. Das infolge der Spin-Bahn--Kopplung am Kernort induzierte Magnetfeld ist proportional zu S_z und führt zu einer Hyperfeinaufspaltung jedes einzelnen Elektronenniveaus. Wegen der Unabhängigkeit von S und I sind das innere Magnetfeld und die Abstände der Elektronenniveaus gleich, so daß sich das in Abb.1o c dargestellte Aufspaltungsbild ergibt. Die einzelnen Hyperfeinniveaus sind Mischzustände, bei denen die Projektionen S_z und m_I von Hüllenspin und Kernspin nur gemeinsam das Vorzeichen wechseln. In Abb.1o sind S_z und m_I für einige Niveaus ausgeschrieben. Für $S = \pm 1/2$ spielen auch Matrixelemente außerhalb der Diagonale eine Rolle, sodaß die Zahl der HF - Niveaus größer als bei den anderen Werten von S_z ist (176).

Da $\Delta E_Z \ll \Delta E_{KF}$, ist jedes Dublett wie in 1. einzeln zu berechnen, wobei für den Spinoperator $S' = 1/2$ gilt. Wegen $A_o \ll \Delta E_Z$ kann der Hamiltonoperator von Gl.(38a,b) in seinen elektronischen (38a) und seinen Kernanteil (38b) separiert werden. Zunächst wird also Gl.38a gelöst, d.h. die Eigenwerte und Spinerwartungswerte werden für jedes Dublett n einzeln bestimmt und dies dann in Gl.38b eingesetzt. Man erhält wieder eine Überlagerung von 3 boltzmanngewichteten Mößbauerspektren. Abb.11 zeigt die Übergänge für das Subspektrum $S_z = \pm 1/2$.

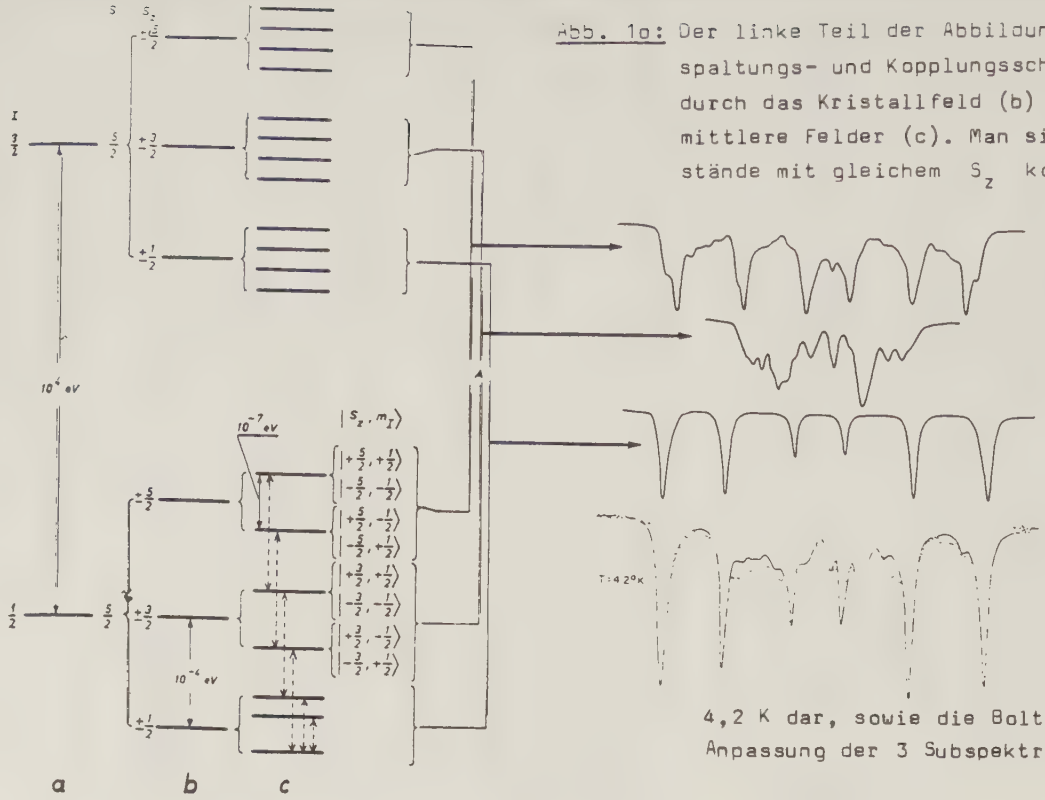


Abb. 1a: Der linke Teil der Abbildung zeigt das Aufspaltungs- und Kopplungsschema von ^{57}Fe-$^{6}S_{5/2}$ durch das Kristallfeld (b) und kleine bzw. mittlere Felder (c). Man sieht, daß nur Zustände mit gleichem S_z koppeln.

Die rechte Seite, übernommen von Referenz (159), zeigt Simulationen der Spektren für jedes einzelne Kramers-Dublett. Sie sind nicht Boltzmann-gewichtet. Das untere Spektrum stellt das Siderophor Enterobactin bei 4,2 K dar, sowie die Boltzmann- gewichtete Anpassung der 3 Subspektrensimulationen.

3. $A_0 << \Delta E_{KF} << \Delta E_Z$

Der Übergang zwischen dem Grundzustand des Kerns und dem angeregten Zustand kann wegen E_Z E_{KF} nicht mehr für jedas Kramers-Dublett separat behandelt werden. Der effektive Spin entspricht mit S'= 5/2 dem realen Spin S =5/2. Da die Hf-Kopplung viel kleiner ist, kann wiederum Kristallfeld- und elektronischer Term separat behandelt werden, allerdings für das gesamte Multiplett. Die Aufspaltung der Kramers-Dubletts des Grundzustands im starken Magnetfeld zeigt Abb.12 . Übergänge erfolgen ähnlich wie in Abb.11 zwischen diesen Zuständen und denen des angeregten Kernzustands. Es resultieren 6 Spektren.

Durch Diagonalisierung von Gl.38a werden die 2S+1 = 6 Eigenzustände $|i>$, Eigenwerte E_i und Spinerwartungswerte $<\vec{S}_i>$ gewonnen und in Gl. 38 b eingesetzt:

$$\hat{H}_n = <\vec{S}_i> \hat{A} \hat{\vec{I}} - \beta g \vec{H} \hat{\vec{I}} + \frac{eQV_{zz}}{4}\left[\hat{I}_z^2 - \frac{5}{4} + (\hat{I}_x^2 - \hat{I}_y^2)\right] \quad (39)$$

Es wird über alle Eigenzustände i mit den jeweiligen Boltzmannfaktoren summiert. Im Einzelnen: Die 6 elektronischen Basiszustände $|S_z>$ bilden zusammen mit den Basiszuständen des Kerns $|m_I>$ Produktzustände $|S_z>|m_I>$, und der Spin-Hamiltonoperator wirkt auf diese Produktzustände. Im Grundzustand liegt somit eine 12x12 Spinhamiltonmatrix vor, für den angeregten Zustand eine 24x24 Matrix (163). Die Matrizen werden diagonalisiert, um die Energie der Eigenzustände i = (2S+1)(2I+1) zu finden. Dann werden die 288 Übergangswahrscheinlichkeiten und Linienlagen berechnet, um so das Mößbauerspektrum zu simulieren. Diese Berechnungen werden für alle anderen Richtungen des Feldes und des Gammastrahls strahls wiederholt(in dem in dieser Arbeit verwendeten Rechenprogramm: 15 Meßpunkte pro Oktant). Die so erhaltenen 6 Spektren werden mit gleichen Gewichten addiert, um ein Spektrum für einen statistisch verteilten Absorber zu simulieren.

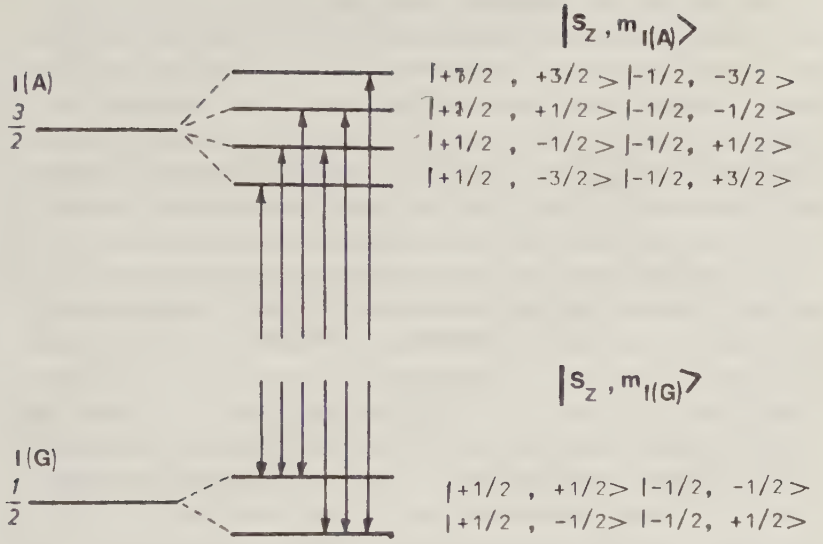
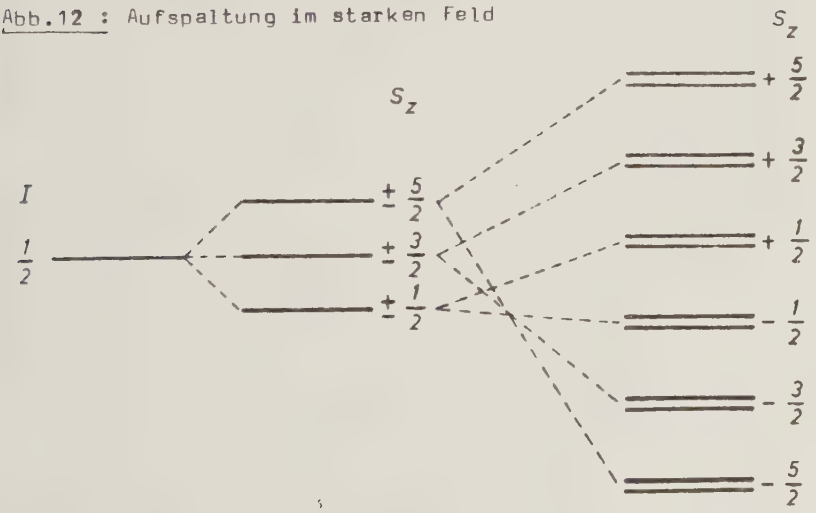


Abb.11 : Übergänge eines Subspektrums von Abb.1o

Abb.12 : Aufspaltung im starken Feld



Die Methode des starken Feldes kann ebenfalls für mittlere Felder angewendet werden, $\Delta E_z \simeq \Delta E_{KF}$. Ist das angelegte Feld klein genug, daß eine merkliche Mischung der elektronischen Zustände durch das Feld erfolgen kann, bewirken die Elektronenzustände $|+i\rangle$ und $|-i\rangle$ dasselbe Mößbauerspektrum. Trotz der Näherung des starken Feldes sind effektiv dennoch nur 3 Subspektren festzustellen. Die Näherung des starken Feldes ist auch die, in dieser Arbeit geübte Praxis.

Im Datenvergleich mit der Literatur muß unbedingt darauf geachtet werden, daß die gewonnenen HF-Kopplungsparameter für beide Näherungen unterschiedlich sind. In der Näherung schwacher Felder ist $\underline{\underline{A}}'_n$ analog zu g anisotrop und für jedes Dublett unterschiedlich. In der Näherung starker Felder gilt $\underline{\underline{A}}$ für das gesamte System und ist meist isotrop. Eine Beimischung höherer elektronischer Zustände kann natürlich über einen nicht verschwindenden Orbital-und Dipolanteil (s.II. 2.5.) eine Anisotropie verursachen. Es wurde jedoch bisher nur einer einzigen Verbindung im ^6S-Zustand eine kleine Abweichung der Isotropie für $\underline{\underline{A}}$ festgestellt (32). Im übrigen gilt für den Vergleich der beiden Näherungen:

$$A_n \langle \vec{S}_i \rangle = A_{n(i)} \langle \vec{S}'_i \rangle \text{ , aber: } A_o \neq A_{n(i)}, \langle \vec{S}_i \rangle \neq \langle \vec{S}'_i \rangle$$

III. MATERIAL UND METHODEN

III.1. CHEMIKALIEN

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien waren analysenreine Substanzen der Firma Merck AG, Darmstadt.

Von Fluka AG, Buchs, Schweiz:
1,4-Diamino-butan-dihydrochlorid (Putrescin)

Von Koch Light Lab. Ltd., Colnbrook-Bucks, U.K.:
Unisolve-1

Von NEN Chemicals GmbH, Dreieich, BRD:
^{57}Co-Mößbauer-Quelle, in 8/um dicker Rh-Matrix; 1o mCi bei Lieferung

Von Radiochemical Centre, Amersham, U.K.:
$^{55}FeCl_3$ in o,1 N HCl, carrier free (o,55 mCi/ 118 nmol Fe)
^{57}Co-Mößbauer-Quelle, in 8/um dicker Rh-Matrix; 1o mCi bei Lieferung.

Von Rohstoffeinfuhr, Düsseldorf, BRD:
1oo mg ^{57}Fe-Metall(95,1%); 5o mg $^{57}Fe_2O_3$ (95,1%)

Von Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden:
CM-32 Sephadex; LH-2o

Von Serva Feinbiochemica GmbH & Co, Heidelberg:
XAD-2 (2oo-25o/u)

Von Sigma, St. Louis, MO., U.S.A.:
Rinderserumalbumin

Ferricrocin wurde freundlicherweise von Prof. H. Zähner zur Verfügung gestellt.

Ferrichrom wurde von Dr. K. Hantke überlassen.

Ferrichrysin war eine Gabe von Prof. W. Keller-Schierlein.

III.2. VERSUCHSORGANISMEN

Neurospora crassa 74 A (Wildtyp)

Neurospora crassa arg-5, ota, aga R 3

Bei dieser Tripelmutante sind alle drei zu Ornithin führenden Enzyme blockiert: die Acetylornithin-Transaminase, die Ornithin-Aminotransferase und die Arginase (4o). Da Ornithin Vorstufe für die Siderchromsynthese ist, kann diese Mutante völlig siderchromfrei kultiviert werden (41). Die Mutante wächst in Minimalmedium (III.3.) bei Zusatz von Asparagin, Arginin und Putrescin. Im Text wird die Mutante kurz mit 'ota' bezeichnet.

III.3. ANZUCHTBEDINGUNGEN FÜR MYCELBILDENDE NEUROSPORA CRASSA STÄMME

Zur Gewinnung von Konidiosporen wurden die Stämme 74 A und 'ota' auf festem Komplexmedium mit 2% Agar, o,4% Hefeextrakt, 1% Malzextrakt und 2% Glucose in 5oo ml Erlenmeyer-Kolben angezogen. Nach mindestens 7 Tagen Inkubation bei 27^{o} C wurden die Konidien steril geerntet durch Abschwemmen mit Saline und Filtration über Glaswolle. Nach mehrmaligem Waschen in Saline bei 2ooo rpm erfolgte die Aufbewahrung bei 4^{o} C in dichter Packung (41).

Die Flüssigkultur erfolgt in einem chemisch definierten Minimalmedium mit 5g L(-)-Asparagin; 2 g $K_2HPO_4 \cdot 3\ H_2O$; 2 g $MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$; 1 g $CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$; 1o/ug Biotin; 2oomg Putrescin; 1oo mg Arginin; 2 g Glucose (getrennt autoklaviert). Diese Substanzen werden in 2 l H_2O dest. gelöst und auf pH 5,5 eingestellt.
Dieses Medium ist für N.crassa im Gegensatz zu Bakterien ein Eisenmangelmedium ($1o^{-6}$M Fe), d.h. der Wildtyp beginnt verstärkt Desferricoprogen ins Medium auszuscheiden (K_m-Wert der Coprogenaufnahme liegt bei $1o^{-5}$M).

Für die ^{55}Fe-Siderophor-Untersuchungen wurden 1oo ml Minimalmedium in 5oo ml Erlenmeyer-Kolben (mit einer Schikane) mit o,1 ml dichter Sporenpackung beimpft und bei 27° C sowie 12o upm inkubiert. Nach 16 Stunden konnte die ausgekeimte Sporensuspension von 'ota' für Aufnahmeversuche verwendet werden.
Für die ^{57}Fe-Siderophormessungen wurden 2 l Minimalkultur in 5 l Erlenmeyer-Kolben mit 1,5 ml Sporenpackung beimpft bei 27° C und 11o upm 36 Stunden inkubiert, um ausreichende Mycelmengen für die Mößbauer-Messungen zu erhalten.

III.4. ISOLIERUNG UND MARKIERUNG DER SIDEROPHORE

III.4.1. Gewinnung von Coprogen

Zur Produktion von Desferricoprogen wurde das in III.3 beschriebene Minimalmedium für Flüssigkulturen benutzt.
Die Anzucht von Neurospora crassa 74 A im Eisenmangel erfolgte nach steriler Zugabe von 3 l Vorkultur in einem 3o l Fermenter (New Brunswick,NJ). Der Fermenter war mit Belüftung(4oo l Luft pro Stunde) sowie einem Blattrührer (2oo upm) versehen und wurde in einem Wasserbad thermokonstant auf 27° C gehalten. Als Antischaummittel diente Siliconöl-Polypropylenglycol im Verhältnis 9 : 1 (2o ml).

Nach 5 Tagen Wachstum konnte Rohcoprogen aus dem Kulturfiltrat gewonnen werden. Dazu wurde zunächst die Konzentration von Coprogen mit Hilfe des von Neilands (43) angegebenen Extinktionskoeffizienten bei 436nm im Zeiss-Photometer bestimmt. Dann erfolgte Zugabe einer äquimolaren Menge $FeCl_3$ zum Kulturfiltrat, wodurch unter Färbung nach rotbraun Desferricoprogen das Eisen komplexierte. Nach Adsorption des Rohcoprogens an Dowex XAD-2 (5 l- Säule; Lösungsmittel zur Vermeidung von Blasenbildung "entgast") konnte durch Waschen mit H_2O überschüssiges Eisen und Rückstände des Mediums abgetrennt werden. Das Roh-

coprogen wurde mit einem Aceton-Wasser-Gemisch im Verhältnis 1 : 1 eluiert, im Rotationsverdampfer eingeengt und die konzentrierte Lösung lyophilisiert. Die Ausbeute betrug 6,5 g Rohcoprogen.

Die Reinheitsprüfung des Rohcoprogens erfolgte dünnschichtchromatographisch auf Kieselgelplatten (Kieselgel 6o). Als Laufmittel diente Chloroform : Methanol : Wasser(dest.) im Verhältnis 65 : 25 : 4 (43). Es wurden dabei 8 Komponenten festgestellt und durch Vergleich teilweise identifiziert.

TABELLE 3

	Dimerumsäure(?)	Coprogen B	(?)	(?)	(?)	Coprogen	Ferricrocin	(?)
R_f	o,o6	o,25	o,28	o,34	o,38	o,45	o,52	o,7o

III.4.2. Reinigung von Coprogen

Coprogen B und weitere, unbekannte Komponenten(hellrot und violett) ließen sich durch Adsorption an CM 32 abtrennen. Dieser Vorgang wurde 2 mal wiederholt. Das adsorbierte Material wurde mit Ameisensäure (5 Tropfen Säure auf 1oo ml H_2O) eluiert. Der Durchlauf hingegen wurde zur Trockne eingeengt, in Methanol aufgenommen und von ausgefallenem Protein abfiltriert.

Das Filtrat wurde nach Einengung auf eine 4 l-Säule,mit LH-2o beschickt, aufgetragen. Auf LH-2o lassen sich 4 Banden ausmachen. Bei der am zweitschnellsten laufenden, braunen Bande handelt es sich um Coprogen, die sich mit der ebenfalls braunen ersten Bande überlappt, weswegen die Reinigung an LH-2o wiederholt werden mußte. Sauber getrennt laufen eine langsamere gelbe(Ferricrocin+ nicht identifiziertes Siderophor) und eine leicht bräunliche 4. Bande(ebenfalls noch nicht identifiziert).
Das so isolierte Coprogen ist hochrein.

III.4.3. Überprüfung der Reinheit von Coprogen

Die Identifizierung und Überprüfung auf Reinheit erfolgte auf 3 Wegen.

1. Dünnschichtchromatographisch konnte nur eine homogene Bande ausgemacht werden, mit dem für Coprogen ermittelten R_f-Wert.
2. Elementaranalyse(M.G.821.6)

theoretisch	C: o.511	H:o.o65	N: o.1o2
praktisch	C: o.5o5	H:o.o64	N: o.1o1

3. FD-Massenspektrum.
   Der Molekülpeak liegt bei 821,6 Dalton

III.4.4. Reinigung der übrigen Siderophore

Ferrichrom, Ferrichrysin und Ferricrocin wurden nach dem in III.4.2. beschriebenen Verfahren an LH-2o gereinigt. Die Reinheit wurde mit DC und Elementaranalyse überprüft.

Ferricrocin	theoretisch	C:o.433	H:o.o59	N:o.163
	praktisch	C:o.435	H:o.o54	N:o.161
Ferrichrysin	theoretisch	C:o.434	H:o.o6o	N:o.157
	praktisch	C:o.435	H:o.o62	N:o.155
Ferrichrom	theoretisch	C:o.438	H:o.o57	N:o.17o
	praktisch	C:o.434	H:o,o56	N:o.17o

III.4.5. Herstellung von Desferrisiderophoren

Die Herstellung von Desferrisiderophoren wurde wie beschrieben (44) mit 8-Hydroxychinolin in methanolischer Lösung durchgeführt. 8-Hydroxychinolin bildet mit zahlreichen Metallionen quantitativ fällbare Oxinate. Das in Methanol unlösliche Eisen(III)oxinat wurde mit Chloroform ausgeschüttelt. Die Desferrisiderchrome wurden im Lyophilisator gefriergetrocknet.

III.4.6. Herstellung von ^{55}Fe-Siderophoren

2o nmol Desferrisiderophor in 4 ml H_2O dest. wurden mit 1oo µl $^{55}FeCl_3$(o,55mCi/ml; 118 nmol/ml) versetzt und einen Tag bei Zimmertemperatur belassen. Die Aufbewahrung erfolgte bei -2o° C. Die Vollständigkeit der Komplexierung des

des ^{55}Fe wurde nach dünnschichtchromatographischer Trennung im Scanner überprüft.

III.4.7. Herstellung von $^{57}Fe_2(SO_4)_3$

^{57}Fe bzw. $^{57}Fe_2O_3$ wurden in einem Becherglas mit rauchender H_2SO_4 erhitzt. Nach mehreren Stunden war alles gelöst. Die Lösung wurde in einer Abdampfschale mit einem Oberflächenverdampfer zur Trockne eingeengt. Der amorphe, grauweiße Rückstand ist reines $^{57}Fe_2(SO_4)_3$. Zur Umsetzung mit Desferrisiderophoren wurde das schwerlösliche $^{57}Fe_2(SO_4)_3$ durch Auflösen in 5 ml konzentrierter HCl und anschliessender definierter Verdünnung in lösliche Form gebracht und auf pH 2 eingestellt.

III.4.8. Herstellung von ^{57}Fe-Siderophoren

Von der eingestellten $^{57}Fe(III)$-Lösung wurde eine definierte Menge in ein Becherglas pipettiert und durch Verdünnen auf pH 4 eingestellt. Man erhält eine Suspension von $Fe(OH)_3$ und Fe-Hydroxamatkomplexen. Nach Zugabe eines 1,5-fachen molaren Überschusses an Siderophor wurde zur Vervollständigung der Komplexbildung 24 Stunden stehen gelassen. Um evtl. überschüssiges Desferrisiderophor bzw. $^{57}Fe(III)$ abzutrennen, wurde an XAD-2 adsorbiert, gründlich gewaschen und der Komplex wie üblich mit Aceton-Wasser (1 : 1) eluiert. Nach Einengen am Rotationsverdampfer wurde die Lösung gefriergetrocknet.

III.5. ^{55}Fe-SIDEROPHOR-AUFNAHMEVERSUCHE AN MYCELBILDENDEN STÄMMEN

Kulturen, die 16 Std. in Minimalmedium bei 27° C gewachsen waren, wurden 1 mal gewaschen und im gleichen Volumen Minimalmedium resuspendiert.

Für die zeitabhängige Aufnahme wurde eine entsprechende Menge an markiertem Siderophor zur Zellsuspension gegeben und in bestimmten Zeitabständen je 1 ml entnommen, in ein Zentrifugenfläschchen mit 5 ml Saline gegeben, abfiltriert

über Sartorius Membranfiltern (Porendurchmesser 3 /um) und zweimal mit 5 ml Saline nachgewaschen.

Die Filter wurden mit 8 ml Unisolve-1 nach mehrstündiger Äquilibrierung im Kontron MR 3oo auf ihre Radioaktivität untersucht. Die Berechnung der dpm-Werte erfolgte automatisch. Alle Versuche wurden zweimal durchgeführt und die Mittelwerte berechnet.

III.6. MÖSSBAUERSPEKTROSKOPISCHE MESSUNGEN DER ^{57}Fe-SIDEROPHORAUFNAHME

III.6.1. Problem einer ausreichenden Resonanznuklidkonzentration

A) Resonanzintensität

Die Resonanzintensität eines Mößbauerspektrums in Prozent ermittelt sich aus dem Produkt von Anzahl der ^{57}Fe-Atome, Wirkungsquerschnitt σ ($2 \times 10^{-18} cm^2$), Debye-Waller-Faktor f und einem reduzierenden Faktor A im Quotienten

$$I(\text{in } \%) \sim \frac{1}{A} [^{57}\text{Fe-Atome} \times \sigma \times f]$$

Der Faktor A enthält folgende Komponenten: Durch Faltung der endlichen Quellen-und Absorberlinienbreite ergibt sich ein Faktor 2 ; durch Aufspaltung der Resonanz infolge von Hyperfeinwechselwirkungen ergibt sich ein zusätzlicher Faktor, der proportional zur Anzahl der Resonanzen ist, d.h. im Falle einer Quadrupolwechselwirkung 2 .

Der Debye-Waller Faktor, auch Lamb-Mößbauerfaktor genannt, liegt im Bereich $0 \leq f \leq 1$. Er erhöht sich mit abnehmender Temperatur, sodaß sich in Messungen bei flüssigem He ein sehr hoher f-Wert erreichen läßt ($\sim$ o,9-1). In Fe-Proteinen wurde der f-Faktor bei 77K zu etwa o,6 ermittelt. Dieser Wert wird auch bei den hier durchgeführten Berchnungen zugrunde gelegt.

Die Anzahl der Resonanznuklide läßt sich bei einer natürlichen Häufigkeit des ^{57}Fe von 2,2% durch Anreicherung mit ^{57}Fe um den Faktor 45 erhöhen. Auch durch Verwendung einer

größeren Probenmenge kann die Resonanznuklidkonzentration erhöht werden. Allerdings ist dann u.U. eine Verbreiterung der Absorptionslinien wegen nichtresonanten Streueffekten in Kauf zu nehmen. Außerdem nimmt die Zählrate bei kleiner werdender Resonanznukliddichte exponentiell ab.

B) Rauschen

Entscheidend dür die Güte eines Mößbauerspektrums ist das Peak-Rauschverhältnis. Für das Rauschen gilt:

$$R \sim 1/\sqrt{\frac{\text{counts (total)}}{\text{Kanäle} \cdot \text{sec}} \cdot \text{Zeit}}$$

Das Rauschen kann also durch Verwendung starker Quellen, längerer Meßzeit und niedriger Kanalzahl gedrückt werden. Ein Faktor v an Intensitätsverlust bedingt einen Faktor v^2 des Produktes Meßzeit x Quellenstärke, um dasselbe Peak-Rausch--Verhältnis zu erzielen.

Die Senkung der Kanalzahl verringert zwar die Geschwindigkeitsauflösung; die Verwendung von 256 Kanälen im Sägezahn- bzw. 512 Kanäle im Dreiecksbetrieb erwiesen sich jedoch für die Erfordernisse der vorliegenden Arbeit ausreichend.

Die Meßzeit sollte ein Maximum (etwa eine Woche) nicht überschreiten, da sonst Langzeitinstabilitäten der Elektronik, Erschütterungen, Fremdstrahlung etc. eine Auswertung erschweren oder gar unmöglich machen. Geht man außerdem von einer 5o mCi-Quelle (~ 25ooo counts/sec bei typischem Absorber) und 256 Kanälen aus, dann verringert sich das Rauschen von o,2% nach 2 Tagen auf lediglich o,12% nach 8 Tagen.

C) Peak-Rauschverhältnis in N.crassa-Proben nach Siderophoraufnahme

Wie aus ^{55}Fe-Label-Aufnahmekinetiken dieser Arbeit entnommen werden kann, liegt die adsorbierte Menge Coprogen bzw. Ferricrocin bei etwa 1,2 nmol/mgxmin. Bei einem Anteil von 1 nAtom Eisen pro mg Trockengewicht ergibt sich bei einem 6-Linienspektrum für die Resonanzintensität bei 77K 1,32 $.1o^{-6}$% der 14,4 keV-Linie.

Bei 1o min Aufnahmedauer, Anreicherung mit ^{57}Fe und Substanzmengen von etwa 1g Trockengewicht läßt sich der Effekt

um etwa 2,25 x $1o^5$ steigern, dies entspricht einem Effekt von o,3% . Die Verweilzeit pro Kanal ist 1.2 x $1o^{-4}$ sec (bei 256 Kanälen und 3oo/usec/step), d.h. in 1 sec werden 833.9 Kanäle überstrichen. Bei 7 Tagen Meßzeit folgt ein Rauschen von o,o38 % oder 2/15 des Signals. Unter obigen Bedingungen können also einigermaßen gut aufgelöste Spektren selbst nach nur 1o Minuten Aufnahme erwartet werden.

B) Schichtdicke und Artefaktbildung

Die ermittelte zu benötigende Zellmenge von 1g bezieht sich auf das Trockengewicht; die entspricht einem Lebendgewicht von ca. 2,5 g . Die Dimensionierung unseres Kryostaten ließ jedoch volumenmäßig eine Beschickung solcher Materialmengen nicht zu. Da es sich zudem um einen Durchflußkryostaten handelte, war eine Beschickung mit Proben nur bei Raumtemperatur möglich. Tiefgefrorenes Material muß auf diese Weise zwangsläufig auftauen, was eine unkontrollierte Fortsetzung von Siderophoraufnahme bzw. enzymatischen Umsetzungen zur Folge hat. Des weiteren ist erhöhte Linienverbreiterung und zunehmendes Rauschen bei so hohen Probendicken zu berücksichtigen. Es schien deshalb sinnvoll, mit gefriergetrocknetem Material zu arbeiten. Allerdings stellt sich dabei die Problematik der Artefaktbildung.

Eine Artefaktbildung kann für das Auftreten unveränderter Siderophore und Fe(II) ausgeschlossen werden. Der Gefahr einer Reoxidation von Fe(II) läßt sich durch Aufbewahren unter Stickstoff begegnen. Sekundärreaktionen von neu gebildeten Fe(III)-und Fe(II)-Verbindungen nach Gefriertrocknung kann nicht ganz ausgeschlossen werden, weswegen eine detailliertere Differenzierung der einzelnen Spezies nur mit Vorsicht berücksichtigt werden kann.

III.6.2. ^{57}Fe-Siderophor-Aufnahme

Zu je 2 l Kultur von N.crassa(arg-5,ota,aga) wurden 5o/umol Siderophor pro Liter entsprechend 35mg / l zum Zeitpunkt t=o zugegeben. Nach 1o, 2o, 3o, 6o, 12o, 24o Minuten wurde die Aufnahme gestoppt, indem die Kultur auf ca. 0^o C ab-

gekühlt wurde. Dies erwies sich deshalb als notwendig, weil solch große Mengen an Medium nur in ca. 1o - 15 Minuten abgenutscht werden können. Das Zellmaterial wurde mit etwa 1l eiskalter Saline mehrmals gewaschen und auf 77°K schockgefroren. Danach wurden die Zellproben gefriergetrocknet, in einem provisorischen Manipulator(Plastiktüte) unter stetigem Stickstoffstrom im Achatmörser verrieben , in Polyacrylhalter entsprechender Höhe gefüllt und durch eine Scheibe gleichen Materials mit Probengefäßdurchmesser mittels Kleber verschlossen. Bis zur Messung erfolgte die Aufbewahrung der Proben im Vakuum bzw. unter N_2 .

III.6.3. Das Mößbauerspektrometer

Die Messungen mit externem Magnetfeld und bei 4,2°K wurden am Institut für Angewandte Physik der Universität Saarbrücken durchgeführt. Alle übrigen Spektren konnten mit einem Mößbauerspektrometer der Fa. Elscint im Institut für Theoretische und Physikalische Chemie gewonnen werden. Ein Blockschaltbild der gesamten Meßanordnung ist in Abb. 13 dargestellt. Eine detailliertere Beschreibung der Elektronik ist in (45) zu finden.

Um ein Mößbauerspektrum zu erhalten, wird die Energie des ^{57}Co-Mößbauerübergangs bei 14,4 keV (I=3/2 → I=1/2) zunächst durch eine elektronisch erzeugte Quellenbewegung dopplermoduliert. Die Steuerung der Quellenbewegung erfolgt über einen Funktionsgenerator, dessen elektronisch erzeugtes Spannungs-Zeit-Signal über einen elektromechanischen Wandler, einem sog. Antrieb(transducer) die Bewegung erzeugt. Die Energieskala wird in mm/sec angegeben.

Der Antrieb besteht aus einem Kankeleit-Driver (46,47), bei dem ähnlich wie bei einem Lautsprecher eine Antriebsspule fest mit einer Achse gekoppelt ist, an deren Ende eine ^{57}Co-Quelle befestigt ist; das andere Ende kann für eine weitere Quelle genutzt werden. Als Antriebssignal beim verwendeten Gerät der Fa. Elscint kann wahlweise ein niederfrequenter Dreiecks-oder Sägezahnimpuls dienen, der durch einen Quarzoszillator im Funktionsgenerator erzeugt wird. Es

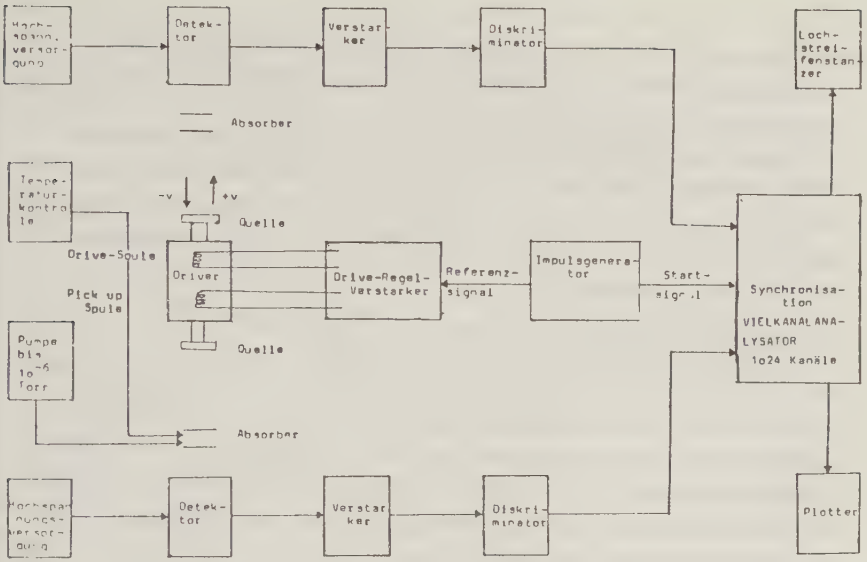


Abb. 13: Blockschaltbild der Mößbauer-Apparatur

besteht die Möglichkeit sowohl mit konstanter Geschwindigkeit als auch mit konstanter Beschleunigung zu arbeiten. Für die Geschwindigkeit der Quelle gilt:

$$v(t) \sim U(t)$$

wobei U(t) die zum Zeitpunkt t angelegte Spannung ist. Von diesem elektronischen Bauteil wird ferner ein Startsignal abgeleitet, um jeweils zu Beginn einer neuen Periode den ersten Kanal eines Vielkanalanalysators (Meda, Elscint) zu öffnen. Außerdem wird ein Kanalfortschaltimpuls erzeugt, um eine eindeutige Geschwindigkeits-Kanalzuordnung zu erreichen.

Die γ-Strahlung der Quelle wird nach Absorberdurchgang von einem Szintillationszähler (MSP, Elscint) aufgenommen. Der Szintillator besteht aus einem Tl-dotierten NaJ-Kristall mit einem Durchmesser von 2mm und einer Dicke von 0,2 mm und einer Nachweiswahrscheinlichkeit bei 14,4 keV von 1oo % sowie einer Auflösung bei 1oo k-counts von 5o % .

Die Ausgangsstromsignale des Detektors, deren Höhe der Energie der Quanten proportional ist, werden durch einen Verstärker (Elscint, Typ CAV-N 3) so verändert, daß mit Hilfe eines Einkanaldiskriminators der allein interessierende Mößbauer-Übergang herausgefiltert werden kann. Die Speicherung erfolgt im multi channel scaling mode, wie oben beschrieben koordiniert durch den Funktionsgenerator, im Vielkanalanalysator.

III.6.4. Mössbauerspektroskopische Messungen und Auswertung

III.6.4.1. Durchführung der Messungen

Die Messungen in Tübingen erfolgten bei Raumtemperatur und 77° K. Zur Kühlung fand ein Durchflußkryostat Verwendung (Hochvakuum 10^{-6} Torr), der konstruktionsbedingt nur bei Raumtemperatur beschickt werden konnte. Die Temperatur im Kryostaten konnte mit einem Thermoelement, Cu-Konstantantan, und einem Refernzstandard (18° C, thermokonstanter Raum) überprüft werden.

Die ^{57}Co-Quellen in Rh-Matrix (8 bzw 12 µm) wiesen eine aktuelle Quellenstärke zwischen 10 und 2,5 mCi auf. Die Spektren wurden je nach Probe zwischen 24 Stunden und 7 Tagen akkumuliert. Um während der Messung eine ständige Kühlung zu gewährleisten, wurde diese alle 2 Tage kurz unterbrochen, um N_2 über einen eigens dafür konstruierten Einfüllstutzen nachzufüllen.

Die Aufnahme der Spektren erfolgte im MCS-Betrieb bei konstanter Beschleunigung. Die Steuerung der Quellenmodulation durch den Funktionsgenerator geschah mit 300 µsec pro step im Dreiecksbetrieb mit 512 Kanälen. Es wurde also jedes Spektrum spiegelbildlich á 256 Kanälen auf genommen, um durch die im nächsten Unterkapitel beschriebene Faltungsprozedur Asymmetrien 1.Ordnung (Geometrieeffekte) eliminieren zu können.

Nach Beendigung der Messung wurden die Kanalinhalte auf Lochstreifen ausgegeben und von diesen auf Lochkarten zur weiteren maschinellen Bearbeitung kopiert.

III.6.4.2. Maschinelle Auswertung der Spektren

Die Faltungs-, Fit- und Plottprogramme wurden mir freundlicherweise von Prof.A.Trautwein und Mitarbeitern (Institut für Angewandte Physik, Universität des Saarlandes, Saarbrücken) zur Verfügung gestellt.
Die Auswertung der experimentellen Daten erfolgte in zwei Schritten.

A) Behandlung der Rohdaten

Wegen der relativen Bewegung zwischen Quelle und Absorber ändert sich der Quellen-Detektorabstand periodisch. Der Öffnungswinkel und die Zählrate sind mithin während eines Beschleunigungssweeps von der aktuellen Position der Quelle und damit von der Geschwindigkeit abhängig (48,49).
Durch Aufnahme eines Doppelspektrums mit anschließender Faltung bzw. durch Berücksichtigung einer Gerätefunktion läßt sich dieser Geometrieeffekt eliminieren (5o-52).
Der Faltungspunkt wird im hier verwendeten Programm gemäß (53) durch Versuchsfaltungen in einem Intervall von vier Kanälen im Zentrum des Doppelspektrums ermittelt. Die Güte der Versuchsfaltungen wird verglichen und so der wahre Wert des Faltungspunktes F bestimmt. Da der Geometrieeffekt nicht bzgl. F sondern bzgl. des geometrischen Mittelpunkts antisymmetrisch ist, wird er vor den Versuchsfaltungen eliminiert, indem eine sinoidale Funktion dem Spektrum überlagert wird.

B) Least squares Fit

In dieser Arbeit konnten Fitprozeduren nur an den α-Eisen-Eichspektren vorgenommen werden, da die Siderophorspektren stark relaxierten. Wohl werden Verfahren beschrieben, die solch dynamische Effekte berücksichtigen (54), jedoch sind entsprechende Programme m.W. in der Literatur noch kaum benutzt worden und waren auch nicht verfügbar.

Die Eichspektren wurden gefittet, um einerseits den Schwerpunkt dieser Spektren und damit den Geschwindigkeitsnullpunkt exakt zu bestimmen und andererseits, um über die

exakte Ermittlung der Linienlagen und deren Vergleich mit Literaturwerten (55-57) eine genaue Kanal-Geschwindigkeits-relation zu erhalten. Die α-Fe-Sechslinienspektren wurden mit 3 Quadrupolpaaren gefittet und die Eichkonstante (Δv pro Kanal) über alle 3 Werte gemittelt.

Als Theoriefunktion Y_i^{theo} konnte wahlweise eine Summe unkorrelierter Lorentzlinien, Quadrupolpaare, magnetische HF oder Kombinationen nach dem Verfahren von Kündig (58,59) benutzt werden. Im einfachsten Fall ergibt sich Y_i^{theo} als Summe individueller Lorentzlinien mit unterschiedlichen Intensitäten und Halbwertsbreiten $\Gamma/2$:

$$Y_i^{theo} = Y_{nres}^{theo} - \sum_{i=1}^{k} \frac{W_k}{(E_k-(v_i/c)E_o)^2+(\Gamma_k/2)^2}$$

wobei Y_{nres}^{theo} die Zählrate im nichtresonanten Teil des Spektrums darstellt. Y_i^{theo} ist insgesamt gesehen eine Funktion von Linienbreite, Resonanzabsorption, HF-Parameter etc. wie es im vollständigen Transmissionsintegral zum Ausdruck kommt (60).
Die gemessenen Werte Y_i^{exp} sind statistisch um ihren jeweiligen theoretischen Wert mit einer Standardabweichung σ_i verteilt. σ_i^2 ist das Quadrat der statistischen Abweichung der Zählrate im i-ten Kanal des MCA, der einem Geschwindigkeitsinkrement v_i bis $v_i + \Delta v_i$ entspricht. Die statistische Verteilung kann als Gaussverteilung angesehen werden. Die Wahrscheinlichkeit, daß ein Meßpunkt zwischen Y_i^{exp} und $Y_i^{exp} + \Delta Y_i^{exp}$ liegt, ist durch folgende Gleichung gegeben (61):

$$p_i = \frac{\Delta Y_i^{exp}}{2\Pi\,\sigma_i} \exp\left\{ - \frac{(Y_i^{theo} - Y_i^{exp})^2}{2\,\sigma_i^2} \right\}$$

Das Produkt $\pi_i p_i$ dieser Wahrscheinlichkeiten erreicht sein Maximum, wenn der goodness-of-fit-Parameter χ^2 ein Minimum aufweist. Dieses Minimum der mittleren quadratischen Abweichung χ^2 zwischen den Datenpunkten Y_i^{exp} und den korrespondierenden Werten der Theoriefunktion Y_i^{theo} lautet:

$$\chi_i^2 = \sum_i \frac{1}{\sigma_j} \left(Y_i^{theo} - Y_i^{exp} \right)^2 = \sum_i F_i^2 = f(x) = \text{Minimum}$$

Als Fitparameter x_i werden nichtresonante Intensität (in counts), Linienlage (in Kanälen; bei Linienmultiplett: die linke), Linienbreite $\Gamma/2$ (in Kanälen), HF-Aufspaltung (in Kanälen), Linienintensität (in counts) eingegeben. Ferner kann zwischen Gauß- und Lorentzlinien, Art der HF-Intensitätsverhältnisse(1:1; 3:2:1) und verschiedenen Arten von Verknüpfungen zwischen Unterspektren gewählt werden.
Um das Minimum χ^2 zu erhalten, müssen die partiellen Ableitungen nach obigen Parametern x_i null gesetzt werden. Die wird mit einem Iterationsverfahren nach Linearisierung des Gleichungssystems bewerkstelligt. Ausgegeben werden die Parameter, ihre statistischen Fehler, χ^2, Schwerpunkt des Spektrums, sowie die korrigierten Meßwerte (graphisch und numerisch).

III.7. MAGNETISCHE MESSUNGEN

Suszeptibilitätsmessungen wurden an einer Gouy-Waage im Institut für Anorganische Chemie bei 3 verschiedenen Feldstärken und in einem Temperaturintervall von 80^{o} K bis 320^{o} K vorgenommen. Das Meßprinzip ist denkbar einfach. Das mit einer ausgewogenen Menge Material gefüllte Probengefäß hängt an einer hochempfindlichen Waage zwischen den Polen eines inhomogenen Magnetfeldes, in das die Probe hineingezogen bzw. von dem sie abgestoßen wird.
Bei der Auswertung müssen von den experimentellen Werten die diamagnetischen Anteile des Probenröhrchens und der Probe abgezogen werden. Während der 1. Anteil durch Eichmessungen sofort zu bestimmen ist, ließ sich der 2. Anteil nicht direkt ermitteln, da nicht genügend Desferriverbindung zur Verfügung stand. Eine Abschätzung des diamagnetischen Anteils anhand von Tabellenwerken für einzelne Molekülgruppen war ebenfalls unmöglich.
Die Gesamtsuszeptibilität stellt eine Überlagerung dar:

$$\chi_{Tot} = \chi_{para} + \chi_{dia}$$

Nach Tasaki et al. (62) läßt sich durch Extrapolation der χ - 1 / T - Kurve auf 1 / T = 0 der diamganetische Anteil recht genau bestimmen, weil in diesem Grenzfall χ_{para} verschwindet. Nach dieser Korrektur erfolgte die Berchnung mit Hilfe eines Auswertungsprogramms auf einem Kleinrechner (Monroe).

IV. ERGEBNISSE

IV.1. SYMMETRIE UND ELEKTRONISCHE STRUKTUR DER SIDEROPHORE

IV.1.1. CD-Spektren zur Ermittlung der Chiralität des Eisen-Zentrums.

Bei fehlenden kristallographischen Daten ist der Circulardichroismus (CD) eine ausgezeichnete Methode, um die Chiralität von Chromophoren - im vorliegenden Fall die Λ- bzw. Δ-Konfiguration um das Eisensentrum - zu ermitteln (s. auch Abschnitt II.1.1.).

Durch Röntgenbeugung konnte von verschiedenen Siderophoren die absolute Konfiguration im festen Zustand bestimmt werden. Schlußfolgerungen für die Konfiguration der gelösten Verbindung lassen sich durch Vergleich von Einkristall-CD in inerter Matrix mit dem CD in Lösung (63), oder durch Vergleich mit in Lösung getrennten, stabilen Λ- bzw. Δ-Isomeren gewinnen. Leong und Raymond ermittelten für Cr(III)-Komplexe von Desferriferrichrom sowie Desferriferrichrysin die Λ-Konfiguration durch einen Vergleich mit dem optischen Λ-cis-Isomeren von Tris(N-Methyl-l-menthoxyacethydroxamato)-Cr(III) (64-66). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß synthetisches, aus D-Ornithin hergestelltes Enantioferrichrom dieselben, jedoch spiegelbildlichen Banden mit gleicher Intensität aufweist, wie das natürliche Ferrichrom (67).

Im Fall von Triacetylfusarinin wurde eine lösungsmittelabhängige Anordnung der Chelatoren festgestellt (63). Anhand der Intensitäten der CD-Banden ließ sich schließen, daß sich in Lösung ein Gleichgewicht zwischen den Λ-und Δ-Isomeren herausbildet. Aus dem Vorzeichen und der Intensität der CD-Banden zwischen 400 und 500 nm kann also die - zumindest vorherrschende - optische Konfiguration am Eisenzentrum ermittelt werden.

Abb.14 zeigt das UV-Vis- und CD-Spektrum von Ferricrocin. Man erkennt eine positive CD-Bande bei 450 nm und muß deshalb für Ferricrocin eine Λ-Konfiguration annehmen. Das

Spektrum ist mit dem der verwandten Verbindung Ferrichrom fast identisch, das sowohl in Lösung als auch in kristalliner Matrix eine reine Λ - Konfiguration zeigt (63). Kristallographische Untersuchungen von Ferrichrom A (68), Ferrichrysin (65,7o) und N,N',N''-Triacetylfusarinin erbrachten, daß diese Siderophore im kristallinen Zustand als Λ - cis-Isomere vorliegen. ORD-Messungen von Ferricrocin, Ferrichrom, Ferrichrysin und Ferrichrom A sind alle sehr ähnlich (74,75). Eine gerade durchgeführte Röntgenstrukturanalyse für Ferricrocin bestätigt den vorliegenden Befund einer Λ-cis-Anordnung für den kristallinen Zustand (76).

Coprogen hat im Gegensatz dazu eine negative CD-Bande bei 475 nm mit dem selben allgemeinen Spektralbild wie Δ - -Tris(benzohydroxamato)Fe(III) (66), s. Abb.15. Dies bedeutet, daß Coprogen ebenfalls ein Δ -optisches Isomeres am Eisen-Sauerstoff-Oktaeder vorliegen hat. Eine Δ - Anordnung wurde bisher hauptsächlich bei Brenzkatechin- Siderophoren wie Enterobactin (77-79) und Ferrimycobactin (8o) nachgewiesen. Bei einkernigen Fe-Trihydroxamatkomplexen ist Coprogen neben dem racemischen Ferrioxamin E (155) und der lösungsmittelabhängigen Anordnung bei Triacetylfusarinin das einzige Siderophor, bei dem das Δ - optische Isomer beobachtet werden konnte.

Lediglich bei der Dihydroxamsäure Rhodutorulasaäure, die mit Fe(III) einen zweikernigen Komplex bildet, haben beide Eisen-Sauerstoff-Oktaeder ebenfalls eine Δ -Konfiguration (81). Rhodutorulasäure und Coprogen besitzen ein gemeinsames Strukturmerkmal: einen Diketopiperazinring, der möglicherweise für diese spezifische Komplexbildung mit verantwortlich ist (s. jedoch auch II.1.3.)

Die spezifische Differenz zwischen Coprogen und Siderophoren des Ferrichromtyps ist hinsichtlich der Erkennung dieser Verbindungen durch einen Rezeptor von Interesse und wird in Kapitel V. ausführlich erörtert.

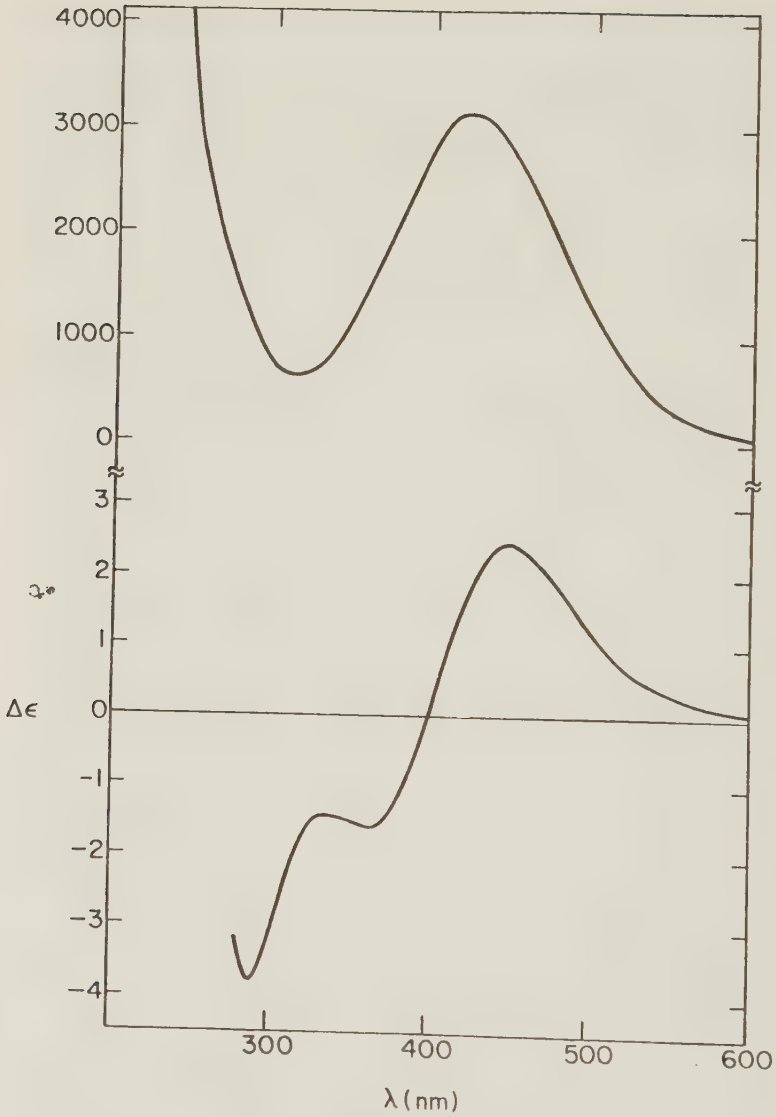


Abb. 14: UV-Vis-und CD-Spektrum von Ferricrocin in wäßriger Lösung.

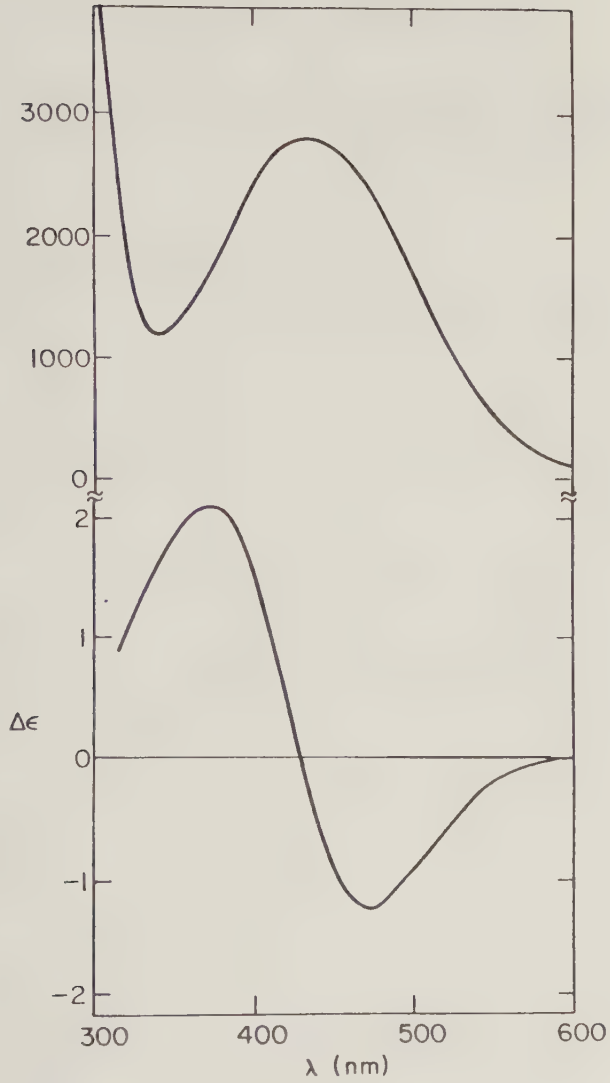


Abb. 15: UV-Vis- und CD-Spektrum von Coprogen in wäßriger Lösung.

IV.1.2. Magnetische Messungen.

Durch die Ermittlung der molaren Suszeptibilität χ_{Mol} und des effektiven magnetischen Moments μ_{eff} können mehrere Eigenschaften bestimmt werden.

- Handelt es sich um eine low- oder eine high-spin-Verbindung?
- Findet im Meßbereich eine Umwandlung von low-in high--spin-Zustände statt oder umgekehrt, wie es im Fall von Ferrimyoglobin festgestellt wurde (71)?
- Finden Phasenumwandlungen im betrachteten Temperaturintervall statt?
- Sind sonstige Abweichungen vom Curie'schen Gesetz zu beobachten, wie z.B. die bei bestimmten Häm-Proteinen auftretende magnetische Ordnung bei abnehmender Temperatur (179)?

Abb.16 und 17 zeigen die χ - 1/T - Diagramme für Ferricrocin und Coprogen. Im Meßbereich ist keine Abweichung vom Curie'schen Gesetz feststellbar. Mithin tritt in diesem Temperaturintervall weder eine magnetische Ordnung noch eine Phasenumwandlung irgendeiner Art ein. Da die magnetischen Messungen nur hinunter bis 80 K vorgenommen werden konnten, waren Aussagen über eventuelle Tieftemperaturabweichungen leider nicht möglich.

Für beide Verbindungen wurde ein effektives magnetisches Moment μ_{eff}= 5,72 Bohr'sche Magnetonen erhalten. Diese Werte sind typisch für Verbindungen von Fe(III) im high-spin-Zustand und weisen auf ein hohes Maß an Ionizität der Fe-O- Bindungen hin. Ein Vergleich mit Ferrichrom (μ_{eff}= 5,68 μ_B) und Ferrichrom A (μ_{eff}=5,73 μ_B) (180) zeigt, daß die ermittelten Werte in der gleichen Größenordnung wie die anderer Siderophore liegen. Mögliche Ursachen des etwas niedriger liegenden magnetischen Moments von Ferrichrom wird im Zusammenhang mit den Mößbauerparametern und pK-Werten im Diskussionsteil behandelt werden.

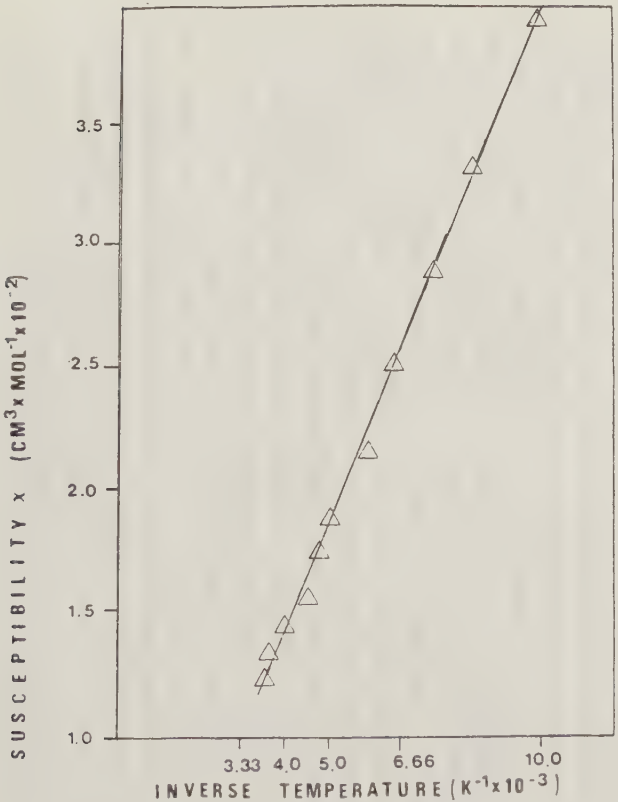


Abb. 17: Temperatur - Suszepibilitäts - -Diagramm von Ferricrocin.

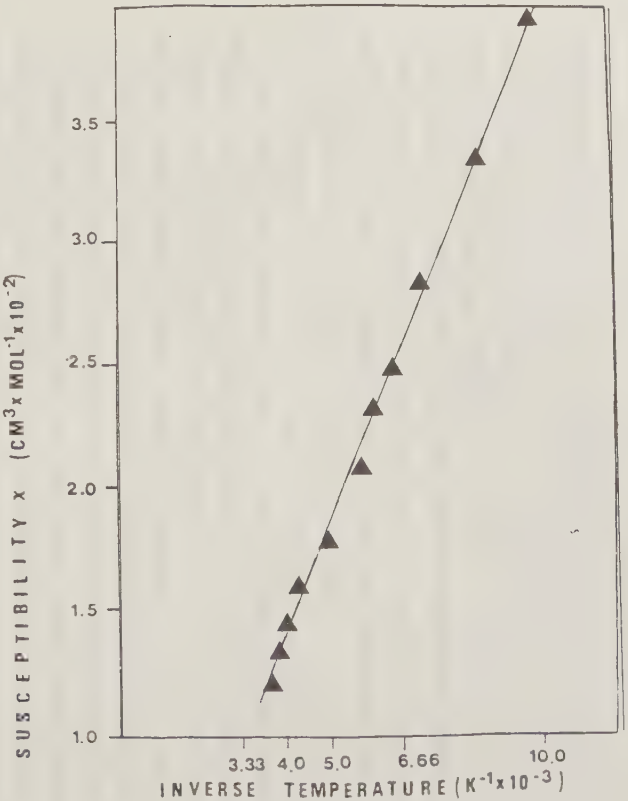


Abb. 16: Suszeptibilitäts - Temperatur - Diagramm von Coprogen.

IV.1.3. pH-und Lösungsmitteleinfluß auf die ESR-Spektren von Coprogen und Ferricrocin.

In Abschnitt II.2.3. und II.2.4. wurden die theoretischen Grundlagen für die Interpretation sowohl der Mößbauer- als auch der ESR-Spektren dargelegt. Leider standen für die Analyse der ESR-Spektren keine Rechenprogramme zur Verfügung, sodaß nur qualitative Aussagen möglich sind.

Ziel der ESR-Untersuchungen war es, zu ermitteln, ob lösungsmittel- oder pH-abhängig Veränderungen der Signale zu beobachten sind, was eine starke Veränderung der Koordination des Eisens anzeigen würde. Die Ermittlung der pH-und Lösungsmittel-Abhängigkeit war deshalb von Interesse, weil die Siderophore beim Durchqueren der Cytoplasmamembran sowohl einen pH-Gradienten als auch eine unpolare Lipidphase als Mikroumgebung wahrnehmen.

Wie aus den Wickman-Diagrammen entnommen werden kann (s.Abb.7,8), ist im Falle vollständiger "Rhombizität (λ = 1/3) für das mittlere Kramers-Dublett ein isotroper g-Wert von ~4,3 zu erwarten. Wie bei vielen anderen Siderophoren e.g.(181) konnte auch bei Coprogen und Ferricrocin (s. Abb. 18) diese dominierende Resonanz beobachtet werden. Dieses Signal wird i.a. mit einer"rhombischen"Symmetrie des Eisenkomplexes interpretiert. Auf die Mangelhaftigkeit dieser Formulierung wurde schon in Abschnitt II.2.3.4. hingewiesen. Trotz der Zweideutigkeit werde ich in Ermangelung besserer (quantitativer) Beschreibungsmöglichkeiten den Begriff "Rhombizität" im Verlauf des Textes weiterhin verwenden.

Um g=1o ist in allen Messungen ein zweites, schwaches Signal zu finden. Nach Theorie muß es vom untersten und/oder obersten Kramers-Dublett herrühren. Die experimentell ermittelten Werte für g ~4,3 und g ~ 9,6 schwanken leicht. Dies kann mit Veränderungen der Asymmetrie des Fe-Oktaeders zusammenhängen, die je nach pH und Lösungsmittel eine Verschiebung der Komponenten des anisotropen g-Tensors verursachen. Aus der "Schärfe" der 4,3g-Signale kann des

weiteren auf eine nur geringe Abweichung von der "rhombischen" Symmetrie geschlossen werden. Leider waren keine Tieftemperaturmessungen möglich. Sie wären nötig gewesen, um das Signal bei hohen Feldern ($g \sim o,6$) nachweisen zu können und um eine höhere Intesität des 9,6g-Signals zu erhalten.

pH-Abhängigkeit der ESR-Signale.

Zwischen pH 2 und pH 12 sind keine gravierenden Unterschiede des Spektralbildes bei Coprogen und Ferricrocin feststellbar(Abb.18.1 a-c; 18.2 a). Während dieser Befund im leicht sauren und neutralen Bereich, in dem das Eisen mit den Siderophoren rotbraune 1:1 Komplexe bildet, zu erwarten war, ist er für den alkalischen Bereich jedoch recht erstaunlich. Bei pH 9 tritt ein deutlicher Farbumschlag nach schwach rosa ein, was auf eine andere Komplexierung des Eisenzentrums deutet. Offensichtlich erfolgt eine Umlagerung in einen anderen, ebenso niedersymmetrischen Komplex.

Interessant ist das Coprogenspektrum bei pH 1 (Abb.18.2b). Neben dem etwas verbreiterten 4,3g-Signal sind zusätzliche schwache Resonanzen bei g= 5,9 und g= 3,3 festzustellen. G-Werte von 6 und 2 können gemäß den Wickman-Diagrammen für trigonale Symmetrie (z-Achse $\langle 1oo \rangle$) erwartet werden, während das g= 3,3-Signal einer trigonalen Symmetrie mit z-Achse in $\langle 111 \rangle$ -Richtung entspricht(163). Bei pH 1 zerfällt der Coprogenkomplex offensichtlich in drei Spezies unterschiedlicher Symmetrie.

Der stark saure pH-Wert von 1 ist für den Protonengradienten der Zellmembran zu tief. Eine Veränderung der Struktur der Siderophore aufgrund des sauren pH an der Cytoplasmamembran ist demnach sehr unwahrscheinlich.

Lösungsmittelabhängigkeit der ESR-Spektren

Als Lösungsmittel wurden Cyclohexanon, Pyridin und Aceton gewählt. In Cyclohexanon sind Coprogen und Ferricrocin nur sehr schwer löslich, in weniger polaren Lösungsmitteln völlig unlöslich. Zur Simulation der Membran wäre die ESR-

Untersuchung einer Lipid-Emulsion wünschenswert gewesen; von diesem Experiment mußte jedoch wegen des zu erwartenden Aufwands abgesehen werden. Das ersatzweise benutzte Cyclohexanon mag jedoch qualitativ den Effekt einer relativ wenig polaren Umgebung wiedergeben.

Eine drastische Lösungsmittelabhängigkeit der ESR-Signale war nicht zu beobachten. Lediglich in Aceton ist das 4,3g-Signal der Coprogenprobe etwas verbreitert. Dies läßt sich mit einem etwas stärkerem Abweichen von der "rhombischen" Symmetrie und der dadurch entstehenden Anisotropie des g-Tensors erklären.

Aufgrund der nur geringen Lösungsmittel- und pH-Abhängigkeit der ESR-Signale im untersuchten Meßbereich, sollte man erwarten, daß beim Aufnahmeprozeß die Siderophore unversehrt die Zellmembran durchqueren, sofern keine Reaktionen (Reduktion, Dekomplexierung etc.) die Struktur der Siderophore während des Transoprts verändert.

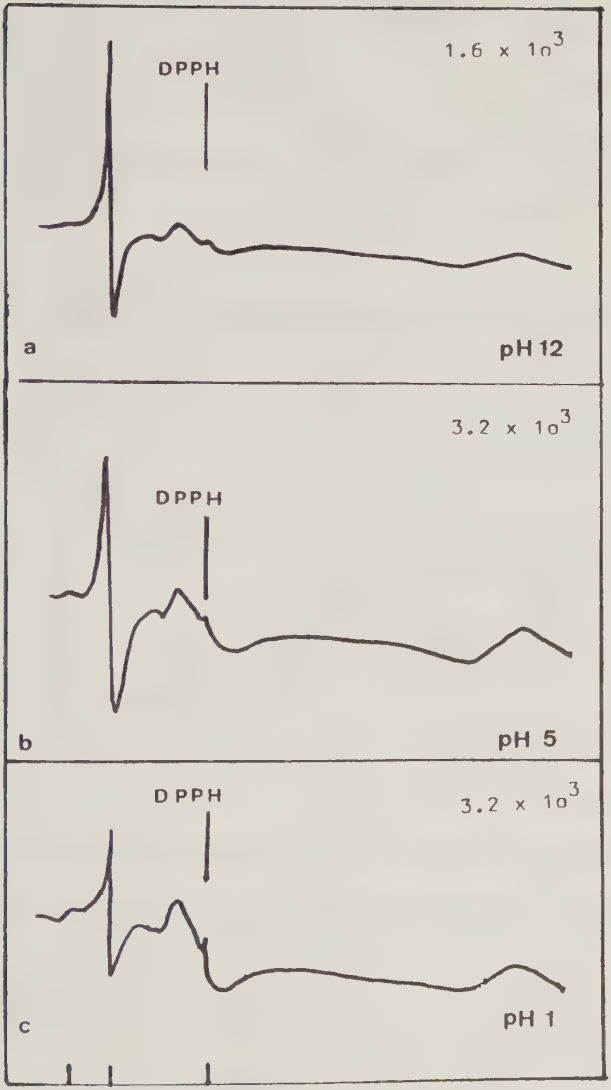


Abb.18.1 : ESR-Messungen von Ferricrocin, pH-abhängig.
Geräte-Parameter- s. Text zu Abb. 18.2.

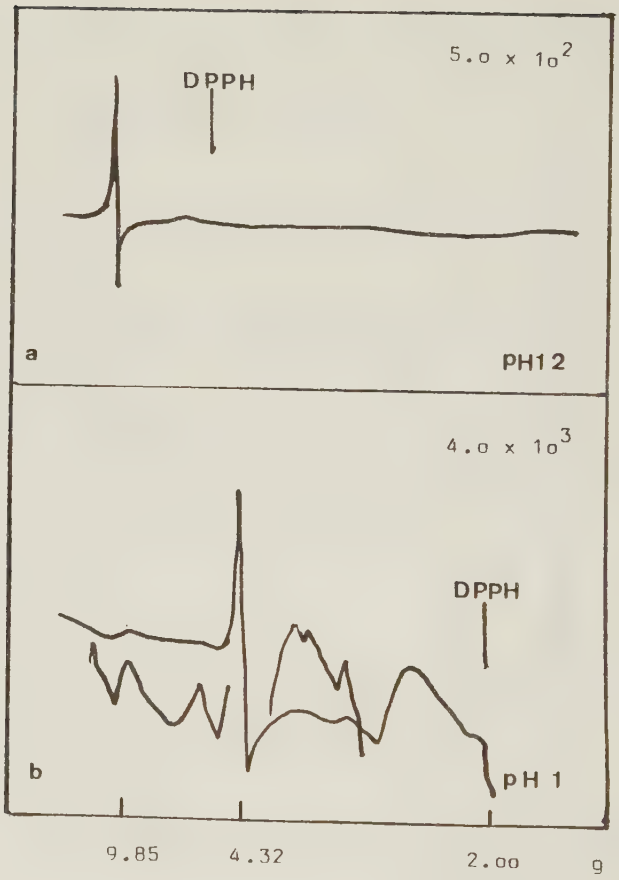


Abb.18.2. : pH-abhängige ESR-Messungen von Coprogen.

Die Geräteparameter lauten für Abb.18.2 b und 18.3 sowie für 18.1. und 18.2a in Klammern notiert: Scan-Bereich: 4ooo(1o ooo)Gauß; Zeitkonstante: o,1(o,1)sec; Modulationsamplitude: 1o(2o)Gauß; Mikrowellenleistung: 1o(1o) mW ; Modulationsfrequenz: 1oo(1oo) kHz; Mikrowellenfrequenz: 9,2(9,2) GHz = x-Band. Die Empfängerverstärkungen sind in jeder Abb. einzeln rechts oben eingetragen.

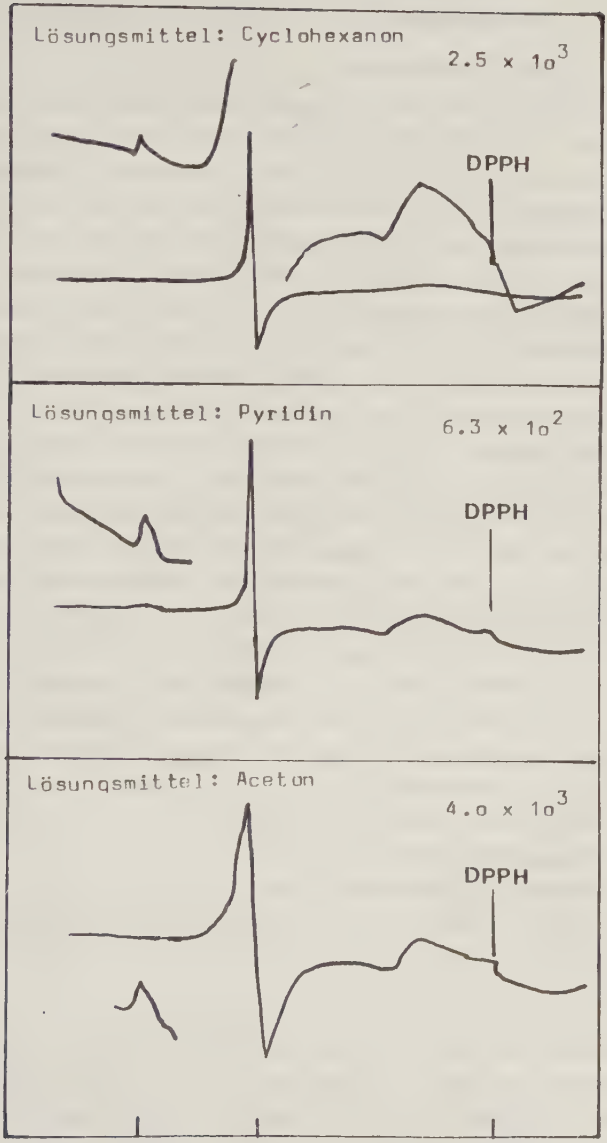


Abb. 18.3.a-c : ESR-Messungen von Coprogen, verschiedene Lösungsmittel (s.Abb. und Text). Geräteparameter - s.Text zu Abb.18.2.

IV.1.4. Mößbauerspektren der Siderophore. Phänomenologie und Berechnung.

Die Untersuchung der mößbauerspektroskopischen Eigenschaften der reinen Verbindungen diente einem doppelten Zweck.

Zum einen sollten aus den HF-Parametern Aussagen über die Symmetrie der Siderophore, wie cis/trans - Isomerie, Verzerrungen des Fe-O-Oktaeders, elektronische Anomalien der Eisenhülle gewonnen werden. Eine Interpretation dieser Parameter sowie deren Korrelation mit ^{55}Fe-Label-Aufnahmekinetiken bei N.crassa kann darüber hinaus Einblicke in die Mechanismen molekularer Erkennung durch biologische Rezeptoren ermöglichen(s.Diskussion).

Zum anderen stellte sich bei der Analyse der Mößbauerspektren über die Siderophoreisenaufnahme durch N.crassa heraus, daß diese in einigen Fällen, erstaunlicherweise insbesondere nach kurzen Aufnahmezeiten, nicht mit den Spektren der reinen, unverdünnten Verbindungen korrelierbar waren. Diese Differenzen basieren auf Relaxationseffekten.

Beide Probleme konnten erst durch die Anwendung einer vom Autor entwickelten Verdünnungsmethode (Rinderserumalbumin) gelöst werden. Zur Übersicht werden folgende 3 Phänomene qualitativ untersucht:

1. Temperaturabhängigkeit
2. Feldabhängigkeit
3. Konzentrationsabhängigkeit

der Mößbauerspektren der Siderophore Coprogen und Ferricrocin.

IV.1.4.1. Temperaturabhängigkeit.

Den Abbildungen 19 bis 26 kann entnommen werden, daß die Mößbauerspektren von Coprogen und Ferricrocin eine starke Temperaturabhängigkeit aufweisen. Bei allen Spektren sind ein parabolisches "Durchhängen", große Linienbreiten, sowie das Auftreten weiterer Absorptionen bei sinkender Temperatur feststellbar.

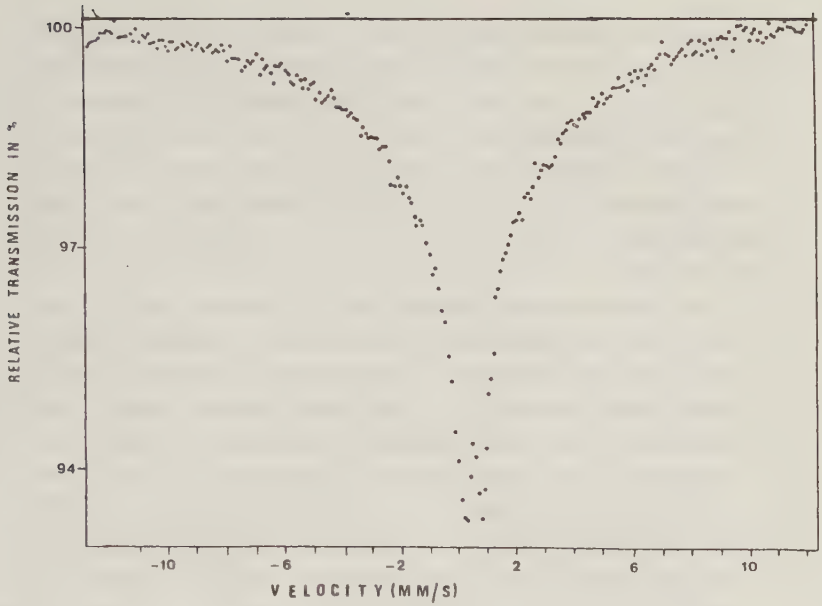


Abb. 19: Coprogen, unverdünnt, gemessen bei Raumtemperatur

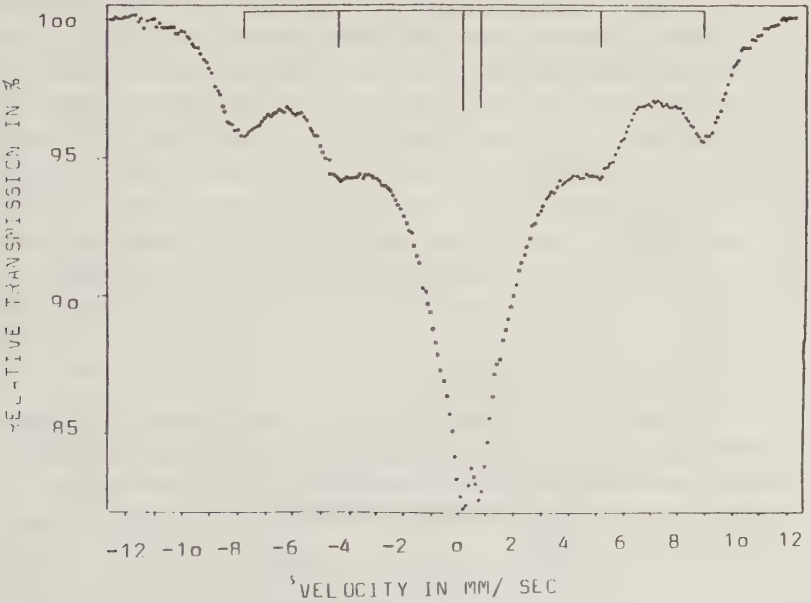


Abb. 20: reines Coprogen, gemessen bei 77 K, ohne Magnetfeld

Aus den Abschnitten IV.1.2. und IV.1.3. resultiert, daß das Eisen bei den Siderophoren Coprogen und Ferricrocin im $^6S_{5/2}$-Zustand vorliegt. Die Komplexität der Spektren ohne angelegtes äußeres Feld kann nur aufgrund der Wechselwirkung des ^{57}Fe-Kerns mit den Hüllenelektronen und der Umgebung entstehen (s.II.2.6.). Die Elektronen der Hüllenzustände zeigen nun in doppelter Weise temperaturabhängiges Verhalten:

1. Das Besetzungsverhältnis der 3 Kramers-Dubletts ändert sich mit der Temperatur. Jedes der 3 Kramers-Dubletts tritt andererseits mit dem Fe-Kern in Wechselwirkung, sodaß das Spektralbild eine Überlagerung dreier Spektren darstellt. Die Gewichtung der Subspektren hängt vom Besetzungsverhältnis und dieses wiederum von der Temperatur ab. Bei genügend hohen Temperaturen, wenn $D \ll kT$, gilt für die Besetzung der Dubletts eine Gleichverteilung. Da $D \sim o{,}5\ cm^{-1}$ ist, entsprechend $\sim 1{,}5$ K, wird die Gleichverteilung schon im Tieftemperaturbereich erreicht. Dieser Anteil erklärt die features der Spektren also nicht.
2. Spin-Spin- und Spin-Gitter-Relaxation. Aufgrund thermischer Bewegung kann der Elektronenspin seine Richtung ändern. Dasselbe gilt für das vom Spin verursachte Feld, das auf den Kern einwirkt. In der Tat konnte anhand der Mößbauerspektren von Ferrichrom A (167), das eine sehr ähnliche Temperaturabhängigkeit des spektralen Aufspaltungsbildes wie Ferricrocin zeigt, demonstriert werden, daß Relaxationsprozesse bis zu tiefsten Temperaturen eine wesentliche Rolle spielen. Deswegen sollen an dieser Stelle kurz die beiden gängigsten Relaxationsprozesse skizziert werden.

Spin-Gitter-Relaxation(SGR)

Die SGR beschreibt einen Transfer elektronischer Zeeman-Energie von einem Spinsystem auf Gitterschwingungsmoden. Nach dem Kronig-van Vleck-Mechanismus(182,183) koppeln die Gitterschwingungen mit den Spins über die Spin-Bahn-Wechselwirkung $\alpha \vec{L} \cdot \vec{S}$. Bei S-Ionen, wie Fe^{3+}, bei denen $\langle \vec{L} \rangle = o$

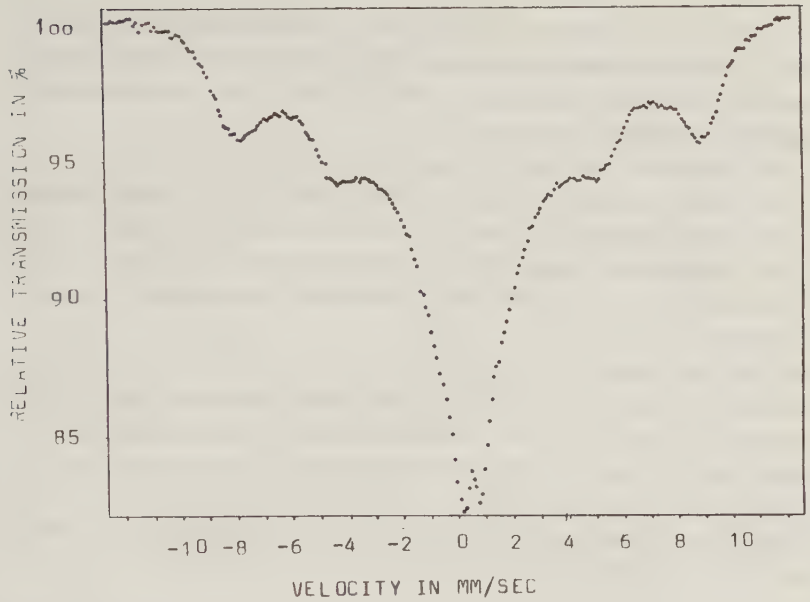


Abb. 21: Mößbauer-Spektrum von reinem Coprogen bei 77 K und einem transversalen Magnetfeld von 1 kOe .

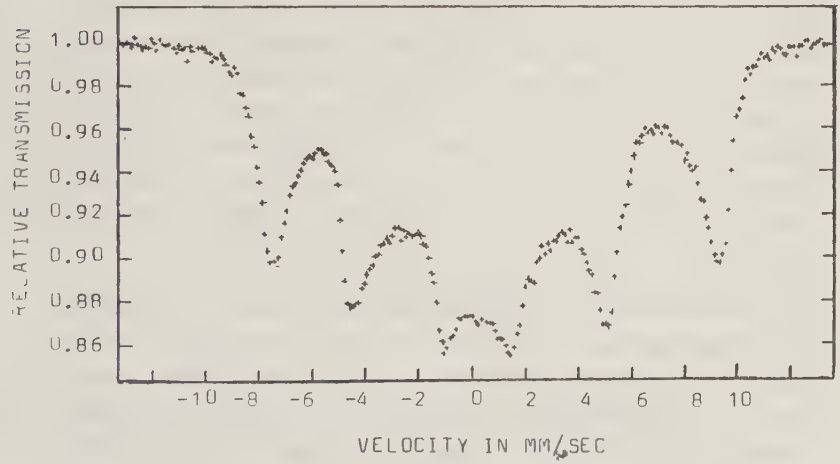


Abb. 22: Mößbauer-Spektrum von unverdünntem Coprogen bei 4.2 K und einem transversalen Magnetfeld von 1 KOe.

ist, kann eine Wechselwirkung über Spin-Bahn-Kopplung nur durch Beimischungen angeregter Nicht-S-Niveaus in den Grundzustand erfolgen, Blume und Orbach (17o). Der SGR-Prozeß kann auf 2 Wegen erfolgen:

- Als direkter Prozeß, d.h ein Übergang des Spinsystems von einem Zustand $|S_A\rangle$ in einen Zustand $|S_B\rangle$ unter gleichzeitiger Erzeugung eines Gitterphonons der Energie E_A-E_B .
- als indirekter Prozeß unter Einbeziehung von 3 oder mehr Spinniveaus und 2 oder mehr Phononen(Orbach-(184),Ramanprozeß).

Bei tiefen Temperaturen dominieren direkte Prozesse, während bei höheren Temperaturen indirekte Prozesse schnellere Raten zeigen. Bei der Berechnung der Übergangsraten ergibt sich für beide Prozesse eine starke Temperatur-und Magnetfeldabhängigkeit (e.g. 156). Bei genügend tiefen Temperaturen kann die SGR verglichen mit der Spin-Spin-Relaxation vernachlässigt werden.

2. Spin-Spin-Relaxation (SSR)

Im Falle langer SGR-Zeiten und kleiner HF-Energien, besteht ein SSR-Prozeß aus gemeinsamen Spin-Flips mit benachbarten Ionen. Das Analogon zum Phonon im Falle der SGR ist der Spin-Flip eines Nachbar-Ions ($|+\rangle \rightleftarrows |-\rangle$). Die SSR ist stark konzentrationsabhängig, aber temperaturunabhängig; die Temperatur wirkt lediglich über das Besetzungsverhältnis der Kristallfeldniveaus. Die starke Konzentrationsabhängigkeit resultiert aus der Entfernungsabhängigkeit der magnetischen Dipol-Dipol- und Austauschwechselwirkung. Beide Wechselwirkungen erfordern Vielkörperberechnungen, für die keine allegemeinen Lösungen existieren.

Bei Raumtemperatur ist weder für Ferricrocin noch für Coprogen der Zustand langer SGR-Zeiten erreicht, wie das starke parabolische Durchhängen zeigt. Die Grenze schneller Relaxationszeiten ($\tau \gg \tau_L$)im Vergleich zur Larmorpräzession des ^{57}Fe-Kerns bedeutet, daß magnetische Felder am Kernort im Zeitmittel o sind. Es können nur noch Qua-

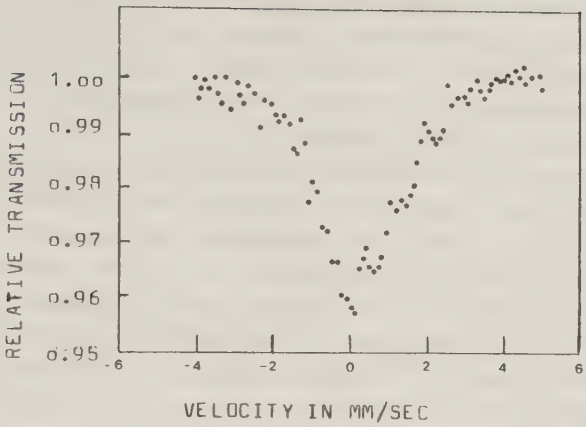


Abb. 23: Mößbauer-Spektrum von Ferricrocin in unverdünnter Form bei Raumtemperatur und ohne externes Magnetfeld.

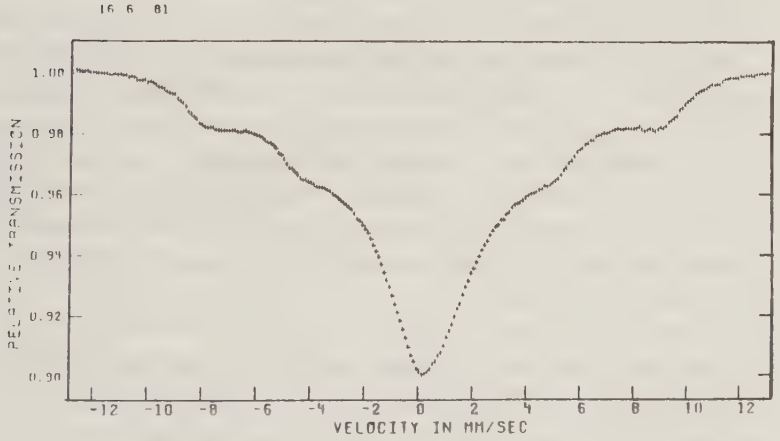


Abb. 24: Mößbauer-Spektrum von unverdünntem Ferricrocin bei bei 77 K, ohne Magnetfeld.

drupolwechselwirkungen festgestellt werden. Wie die Abb. 19 und 23 zeigen, relaxieren beide Siderophore in Richtung Dublett, das allerdings bei Coprogen viel charakteristischer ausgeprägt ist. Das Vorliegen einer Quadrupolwechselwirkung bedeutet in beiden Fällen Symmetrien der Eisenpunktrgruppe $< C_3$ (s.Gleichung 8).

Im Bereich mittlerer Spin-Gitter-Relaxationen ($\tau \approx \tau_L$) ändert sich das Hyperfeinfeld während der Präzession. Die Resonanzen sind breit und verwaschen, die Spektren hängen parabolisch durch. Die Abbildungen 2o und 24 demonstrieren diesen Effekt bei 8o K. Im Bereich sehr langsamer SG-Relaxationen ($\tau \gg \tau_L$) kann das Kernmoment $|M_I\rangle$ mit dem elektronischen Moment $|S_z\rangle$ koppeln. Man sollte aufgelöste Spektren erhalten. Dies ist nicht der Fall. Eine Eklärung wird in den beiden folgenden Abschnitten gegeben.

IV.1.4.2. Feldabhängigkeit.

Es ist üblich, Mößbauerspektren bei kleinen transversalen Feldern von einigen 1oo Oe zu messen. Dies hat zwei Gründe:

1. Beseitigung von Störfeldern. Das Feld bricht i.a. die Kopplung zwischen benachbarten paramagnetischen Ionen, d.h. die Spin-Spin-Relaxation. Das gleiche gilt für die Kopplung zwischen Elektronenspin und den kernmagnetischen Momenten der Liganden(Back-Goudsmit-Kopplung) (177, 178). Bei Fehlen eines äußeren Feldes kann das Kernmoment der Liganden drastische Effekte auf das Mößbauer-Spektrum ausüben. Musterbeispiel für diesen Fall ist Transferrin (111).
2. Durch das Anlegen von Feldern um 1kOe können die Spektren mit der Näherung starker Felder simuliert werden (s. Abschnitt II.2.6.).

Wie den 78 K - Messungen entnommen werden kann (Abb.21, 22, 24 und 25), hat das Anlegen eines transversalen Magnetfeldes von 1 kOe auf das spektrale Aufspaltungsbild der unverdünnten Verbindungen keinen Einfluß. Daraus sollte man schließen, daß keine Spin-Spin-Relaxation, sondern allein eine SG-Relaxation vorliegt. Dies wird allerdings durch die

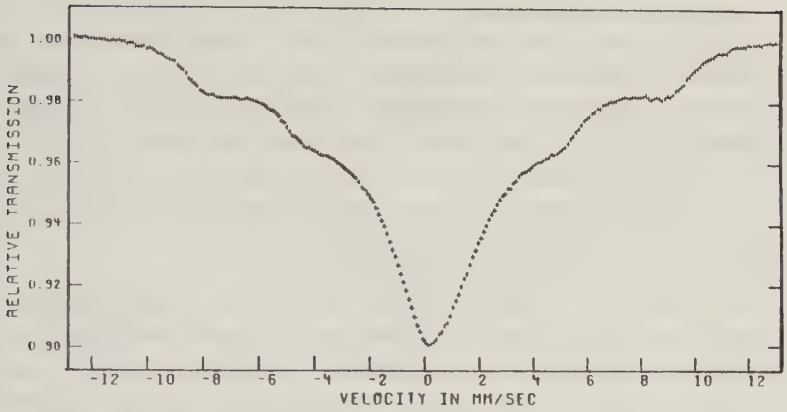


Abb. 25: Mößbauer-Spektrum von unverdünntem Ferricrocin bei 77 K und transversalem Magnetfeld von 1kOe Stärke.

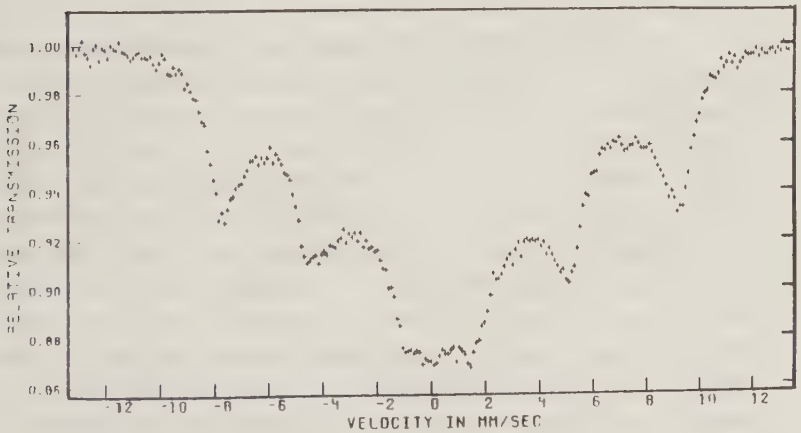


Abb. 26: Mößbauer-Spektrum von Ferricrocin in unverdünnter Form bei 4.2 K und einem transversalen Magnetfeld von 1 kOe Stärke.

Tieftemperaturmessungen widerlegt. Da bei 4,5 K keine SG--Relaxationen mehr zu erwarten sind, müßte man ein aufgelöstes HF-Spektrum beobachten. Dem ist nicht so. Insbesondere im mittleren Teil hängen die Spektren von Coprogen und Ferricrocin noch stark durch und die Absorptionen sind nicht gut aufgelöst. Diese Restrelaxation kann nur auf der Basis von Spin-Spin-Relaxationen erklärt werden.

IV.1.4.3. Konzentrationsabhängigkeit.

Die Spin-Spin-Relaxation ist - wie schon erwähnt wurde - sehr stark konzentrationsabhängig. Ähnlich den Messungen reiner Verbindungen im angelegten Feld im vorigen Abschnitt zeigte auch eine mM wäßrige Lösung von Coprogen bei 77 K (Abb.27) keine wesentlichen Unterschiede des spektralen Erscheinungsbilds im Vergleich mit der reinen Verbindung. Eine quantitative Analyse der Probe in wäßriger Lösung war somit unmöglich. Deshalb konnten auch keine Rückschlüsse auf eine etwaige cis/trans-Isomerie in Lösung gezogen werden.

Um die Situation im Cytoplasma zu simulieren, wurde auch eine Verdünnung mit Rinderserumalbumin vorgenommen. Dadurch konnte der ^{57}Fe-Gehalt bei einem beachtlichen Effekt zwischen o,5 und 6 % auf o,7 Gewichtspromille reduziert werden. Ein Vergleich der Abbildungen 27 - 33 mit den Spektren in Abb. 2o - 26 zeigt, daß die Albuminverdünnung einen enormen Effekt bewirkt. Die diamagnetisch verdünnten Spektren zeigen bei vergleichbarer Temperatur eine bei weitem stärker aufgelöste Struktur. Es liegt also bei den Siderophoren eine äußerst starke Spinkopplung vor, die nicht durch Felder, sondern erst durch extreme Verdünnung beseitigt werden kann. Doch selbst bei dieser äußerst hohen diamagnetischen Verdünnung verbleibt eine Restrelaxation. Wie nämlich die Abb. 28 und 29 sowie 31 und 32 zeigen, bewirkt das Anlegen eines externen Feldes noch Veränderungen des Spektralbildes. Die restliche Spin-Spin-Kopplung wird durch dieses Magnetfeld gebrochen.

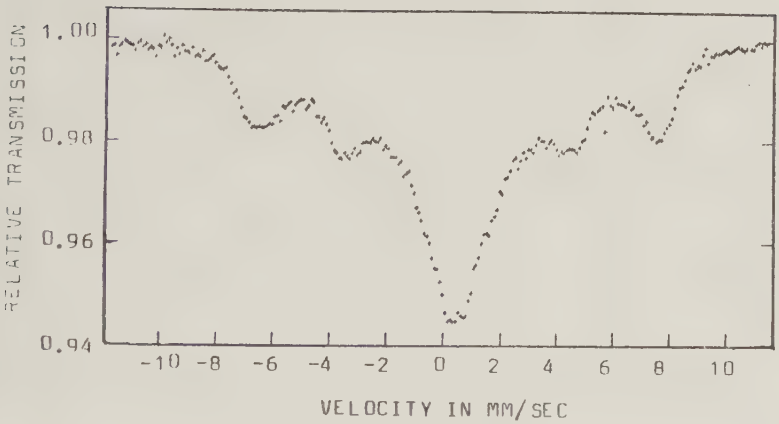


Abb. 27: Mößbauer-Spektrum einer millimolaren wäßrigen Lösung von Coprogen bei 77 K, ohne externem Magnetfeld.

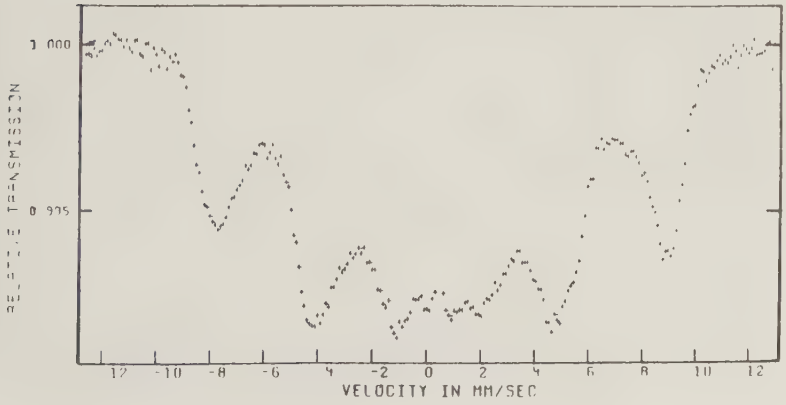


Abb. 28: Mößbauer-Spektrum von Coprogen, auf 5 mg/g albuminverdünnt, bei 77 K und einem transversalen Magnetfeld von 1 kOe.

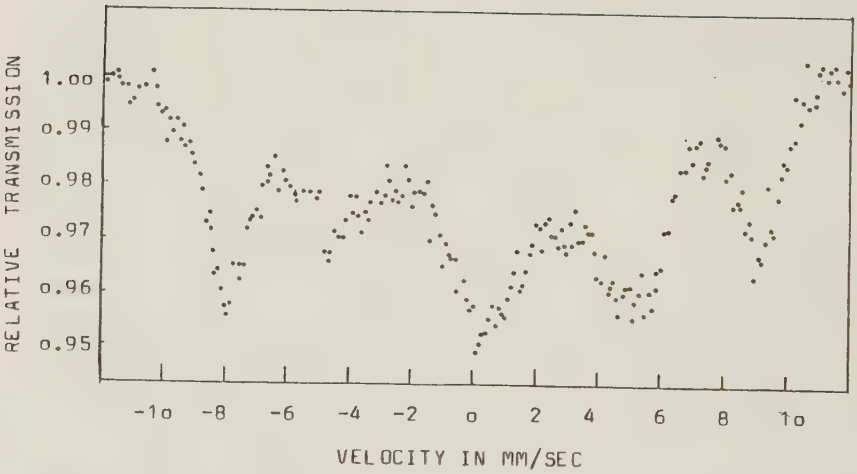


Abb. 29: Mößbauer-Spektrum von albuminverdünntem Coprogen (5mg/g) bei 77 K, H=o .

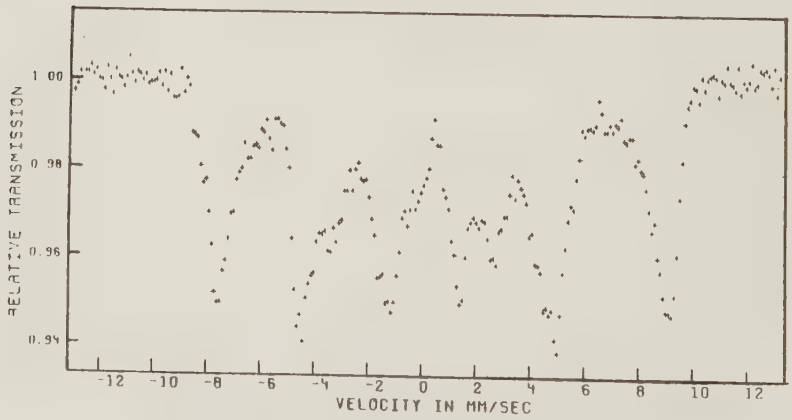


Abb. 3o: Mößbauer-Spektrum von albuminverdünntem Coprogen bei 4.5 K und einem äußeren Magnetfeld von 1kOe.

Wenngleich der Feldeffekt möglicherweise trotz Schockgefrierung auf noch verbliebene Clusterstrukturen zurückführbar sein könnte, ist insgesamt jedenfalls die Spin-Spin-Kopplung bei den Siderophoren Coprogen und Ferricrocin - und wie das Beispiel Ferrichrom A zeigt(113) wohl auch die übrigen Verbindungen dieser Reihe - außergewöhnlich stark ausgeprägt. Die Stärke der durch diese Kopplung verursachten internen Felder könnte im Prinzip durch Variation der Feldstärke bestimmt werden. Leider standen keine geeigneten Magneten zur Verfügung, um diese Frage zu klären. Qualitativ kann jedoch gesagt werden, daß die Stärke der Kopplung mit der Struktur der untersuchten Siderophore zusammenhängen muß. Die Substanzen sind relativ niedermolekular (< 1000 Dalton) und wie aus Röntgenstrukturuntersuchungen hervorgeht, z.B.(68), liegt das Eisen sehr wenig abgeschirmt an der Peripherie des Moleküls. Durch diese Konstruktion scheinen einerseits sehr geringe Fe - Fe - Abstände möglich zu sein, andererseits werden die Felder durch das Molekülgerüst wenig abgeschirmt, weswegen sie über größere Distanzen koppeln können.

Die Spektren 3o und 33 zeigen, daß mit Hilfe der Albuminverdünnung bei 4,2 K der Bereich langsamer Relaxation erreicht ist. Die gute Auflösung im Mittelteil des Spektrums - es wird fast das Niveau des Untergrunds erreicht - belegt, daß praktisch kein parabolisches "Hängen" mehr auftritt. Damit ist es möglich, die Spektren von Ferricrocin und Coprogen quantitativ durch Simulationen zu analysieren. Dieser glückliche Umstand ist allein auf die Verdünnungstechnik zurückzuführen. Wickman mußte z.B. bei 0,98 K (!) messen, um Ferrichrom A quantitativ untersuchen zu können. Selbst bei dieser Temperatur war noch Restrelaxation vorhanden, wie die Linienbreiten des Spektrums zeigten.

Die hier gefundene große Konzentrationsempfindlichkeit der Spektren sollte auch als Sonde für unterschiedliche Mikroumgebungen der Siderophore dienen können. Dies wird in dem Kapitel über Aufnahmeversuche bei N.crassa genauer dargelegt werden.

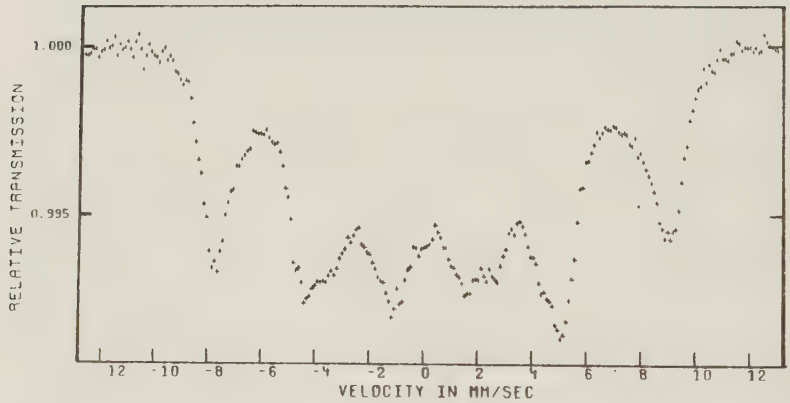


Abb. 31: Mößbauer-Spektrum von albuminverdünntem Ferricrocin bei 77 K und H_{extern} = 1 kOe.

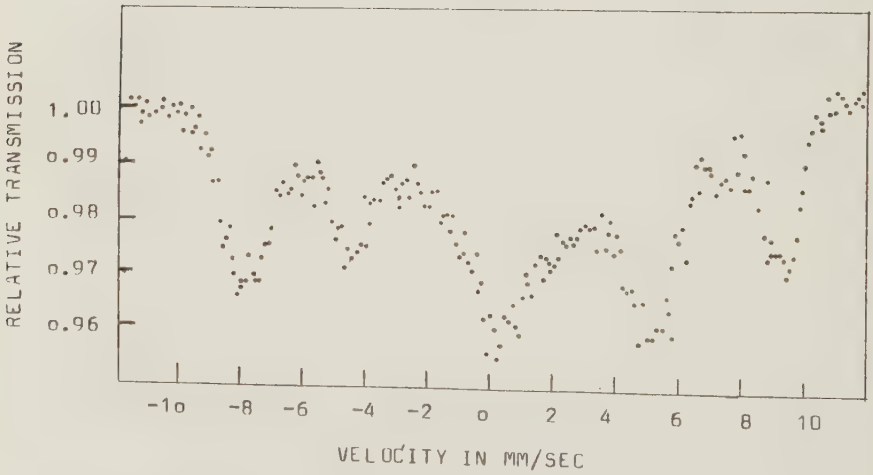


Abb. 32: Mößbauer-Spektrum von albuminverdünntem Ferricrocin bei 77 K, H=0 .

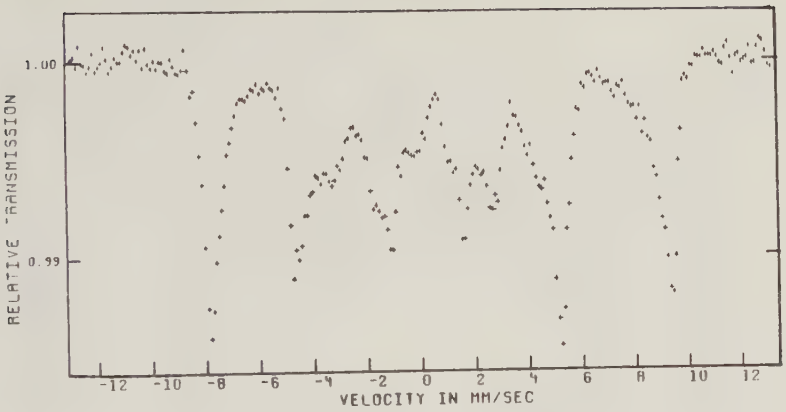
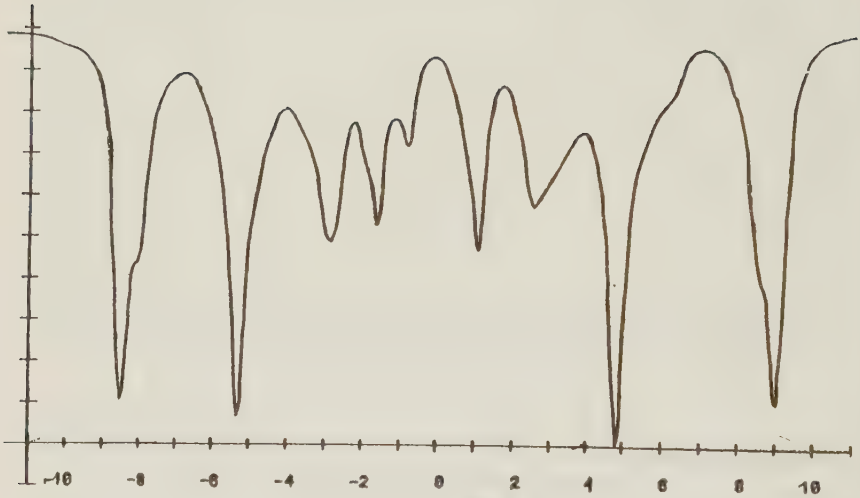


Abb. 33: Spektrum von Ferricrocin in Albuminverdünnung (5mg/g) in einem transversalen Magnetfeld bei 4.2 K .



-1.000 H ⊥	-0.000	ΔE_Q	286.737 $=A_x$
1.000	0.930	η	228.635 $=A_y$
4.500 (Kelvin)	---		366.027 $=A_z$
---	---		0.000
---	---		0.000
15.400	---		0.000
0.460 =D	294.000		1.000
0.310 λ	-600.000		---
---	-560.000		---
2.000 $=g_x$	---		---
2.000 $=g_y$	---		---
2.000 $=g_z$	---		---

Abb. 34: Simulation des Ferricrocin-Spektrums mit anisotroper HF-Kopplungskonstante A.

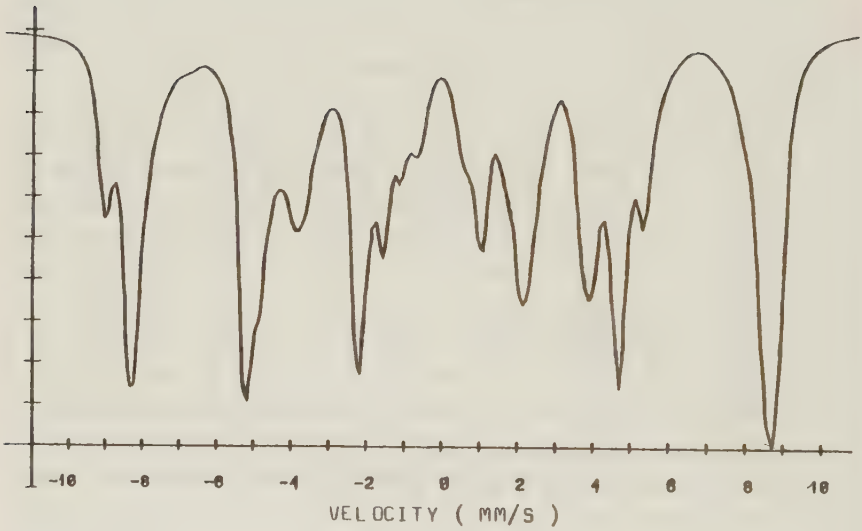
IV.1.4.4. Berechnung der Tieftemperaturspektren. Die Mössbauerparameter.

Bei Simulationen hängt das Profil des resultierenden Spektrums von den Spinhamiltonparametern D, λ, ΔE_Q - η, g, A ($\vec{H}_c$, $\vec{H}_L$, $\vec{H}_0$) ab, die so festzulegen sind, daß die Übereinstimmung zwischen dem berechneten und dem experimentellen Spektrum maximal wird. Zunächst muß versucht werden, die Zahl der unbekannten Parameter zu minimieren. Der verwendete Spinhamiltonoperator hat die durch Gl.(39) modifizierte Form der Gl.(38 a,b). Folgende Vereinfachungen können getroffen werden.

1. Der Spinhamiltonoperator in Gl.38 a ist i.a. dann zur Beschreibung eines Spinsextetts geeignet, wenn g durch den isotropen spin-only-Wert von 2,0023 ersetzt wird.
2. Da sowohl λ als auch P die Asymmetrie der Umgebung des Eisenions widerspiegeln, kann nach Aasa et al.(32) folgende Relation formuliert werden:

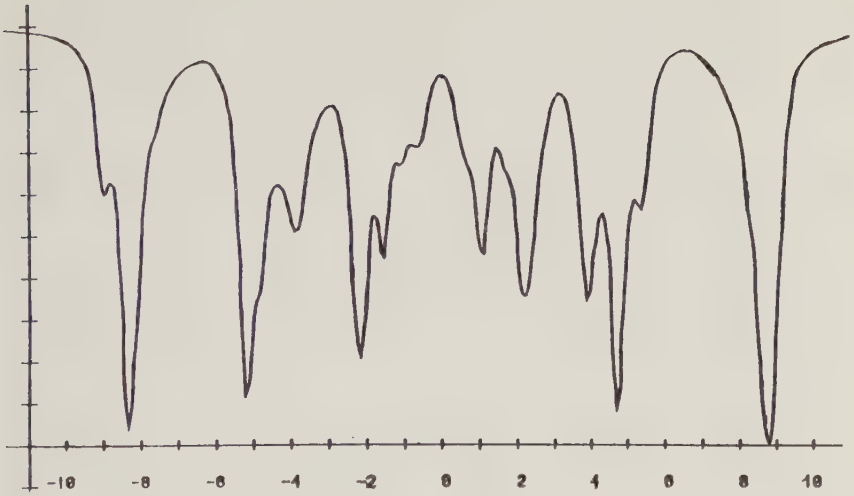
$$\eta = 3\lambda$$

3. Da mit einem Spinhamiltonoperator für ein Orbitalsingulett gearbeitet wird, sollte man einen isotropen HF-Tensor $\underline{A}$ annehmen. A reduziert sich dann zu einer Konstanten A_0. Im Fall von Rubredoxin (33) wurde jedoch experimentell festgestellt, daß die Aufspaltung im höchsten Kramers-Dublett 15% größer ist, als im tiefsten, was auch nicht durch Variation von λ gefittet werden konnte. Für $\underline{A}$ wurde deshalb eine Anisotropie vorausgesetzt. Abb.34 zeigt eine Simulation des Ferricrocinspektrums mit einem anisotropen HF-Parameter. Vergleicht man die Simulation mit dem Fit für Ferricrocin in Abb.38 - außer A sind alle übrigen Parameter gleich - so stellt man drastische Unterschiede des spektralen Erscheinungsbildes fest. Dies läßt den Schluß zu, daß A wie in (32,114) als isotrop angenommen werden darf.
4. Werte für D und λ waren aufgrund von ESR-Messungen (185) verfügbar. Ihre Validität wurde exemplarisch für Ferricrocin durch Variation der Parameter überprüft, s. Abb. 35-37. Ein Vergleich mit der optimierten Ferri-



-1.000	$H\perp$	-0.000	ΔE_Q	225.000	$=A_x$
1.000		0.870	η	225.000	$=A_y$
4.500	(Kelvin)	--		225.000	$=A_z$
--		--		0.000	
--		--		0.000	
15.400		--		0.000	
0.460	=D	294.000		1.000	
0.200	λ	-000.000		--	
--		-560.000		--	
2.000	$=g_x$	--		--	
2.000	$=g_y$	--		--	
2.000	$=g_z$	--		--	

Abb. 35: Simulation des Ferricrocin-Spektrums bei 4,5 K Mit einem Kristallfeldparameter D = 0,46 und einem "Rhombizitätsparameter λ = 0,29



-1.000	H ⊥	-0.000	ΔE_Q	225.000	$=A_x$
1.000		0.000	η	225.000	$=A_y$
4.500	(Kelvin)	--		225.000	$=A_z$
--		--		0.000	
--		--		0.000	
18.400		--		0.000	
0.500	=D	294.000		1.000	
0.294	λ	-600.000		--	
--		-500.000		--	
2.000	$=a_x$	--		--	
2.000	$=a_y$	--		--	
2.000	$=a_z$	--		--	

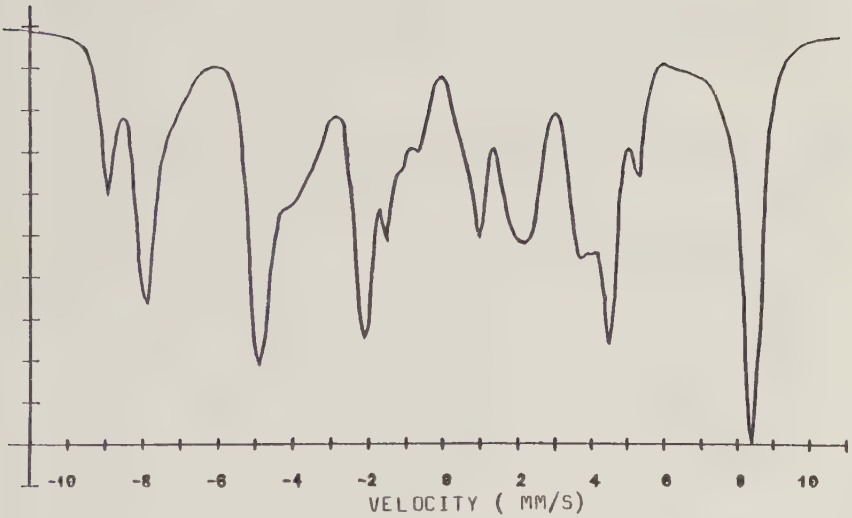
Abb. 36: Simulation des Ferricrocin-Spektrums wie in Abb.35 jedoch mit D = 0,56 .

crocin-Anpassung (Abb.38) ergab, daß die von Dowsing et al. gewonnenen Werte auch für die Simulation der Mößbauerspektren die bestmöglichen sind. Die Abbildungen 35 und 36 zeigen den nur geringen Einfluß der Kristallfeldaufspaltung D auf die Spektren. Eine Aufspaltung von o,5 cm^{-1} entspricht etwa $1o^{-4}$eV oder 1,17 K. Eine Veränderung von D um o,1 cm^{-1}entspräche damit einer Veränderung der Aufspaltung um o,23 K, was keine signifikanten Populationsvariationen bewirkt.
Ein Vergleich der Simulationen 35 und 38, sowie die Simulation von Ferrichrom A (Abb.37) mit Coprogen (Abb.39) demonstrieren den starken Einfluß von λ auf die Spektren.

Die Parameterliste der optimierten Fits der Ferricrocin- und Coprogenspektren ist den Abbildungen 38 und 39 sowie der Tabelle 4 zu entnehmen. Die Ergebnisse stellen auf der Basis des verwendeten Spin-Hamilton-Modells sicher die beste Anpassung dar. Wie jedoch in Abschnitt II.2.3.4. dargelegt ist, bedarf die verwendete Kristallfeld-Näherung einer künftigen Modifikation. Die Ergebnisse sollen nun für die einzelnen Parameter diskutiert werden.

Interpretation von δ und A.

Der Wert für das interne Feld beim freien Fe^{3+}-Ion beträgt - 63o kOe (158). Ionisches FeF_3 hat ein internes Feld von - 62o kOe (186), $FeCl_3$ von - 486 kOe (187). Coprogen und Ferricrocin liegen mit - 55o kOe bzw. -56O kOe dem FeF_3 näher als dem $FeCl_3$, was bedeutet, daß der Grad an "Ionizität" bei beiden Siderophoren ausgesprochen hoch ist. $Fe_2(SO_4)_3$ zeigt $H_{int.}$ = - 55o kOe, E_Q = o,6 mm/s und $\delta_{R.T.}$ = o,39 mm/s



-1.000	H ⊥	-0.600	ΔE_Q	220.000	$=A_x$
1.000		0.750	η	220.000	$=A_y$
4.500	(Kelvin)	-.-		220.000	$=A_z$
..		-.-		0.000	
..		.-.		0.000	
15.400		-.-		0.000	
0.500	=D	-219.000		1.000	
0.250	λ	-600.000		...	
...		80.000		...	
2.000	$=g_x$	-.-		-.-	
2.000	$=g_y$	...		...	
2.000	$=g_z$	.-.		-.-	

Abb.37 : Simulation des Ferrichrom A - Spektrums auf der Basis der Literaturwerte von Wickman (157). Man erkennt, daß λ die Spektren stark verändert.

welche Elektronenverteilung bei den hier untersuchten Siderophoren vorliegt. Da eine genaue Bestimmung umfangreiche MO-Rechnungen erfordert, die nicht durchgeführt werden konnten, können nur grobe Schätzungen abgegeben werden.

Wie in Abschnitt II.2.1. gezeigt wurde, nimmt bei Eisen mit abnehmender $|\psi_s(o)|^2$ die Isomerieverschiebung zu. Umgekehrt bedeutet eine zunehmende s-Elektronendichte der Hülle auch eine größere s-Spindichte am Kernort und mithin eine Abnahme der Isomerieverschiebung. Die Beispiele $FeCl_3$ und FeO_6^{9-} zeigen, daß auch die d-Elektronen variieren können. Eine zunehmende d-Elektronendichte wirkt gerade umgekehrt wie eine Zunahme der s-Elektronendichte. Über die Konfigurationswechselwirkung bedingt die d-Zunahme eine effektive Abnahme der s-Spindichte am Kern und deswegen eine Zunahme der Isomerieverschiebung.
Die etwa gleich große Isomerieverschiebung von Coprogen und Ferricrocin muß wegen dieser gegenläufigen Tendenzen (s. auch Tabelle 1, II.2.5.1.) nicht zwangsläufig die gleichen elektronischen Verhältnisse widerspiegeln. Um genauere Aussagen zu gewinnen, ist es notwendig das innere Feld, repräsentiert durch den Kopplungsparameter A, mit zu berücksichtigen. Auf der Basis der Freeman'schen Interpolationsformeln ist dann möglich, den Anteil der d-und s-Elektronen am Feld abzuschätzen. Rechnerisch ergeben sich bei einem internen Feld von -55o bzw. -56o kOe und verschieden angenommenen d-Dichten aus den Freeman'schen Interpolationsformeln folgende Werte:

- 56o kOe : $3d^{5,o}{}_{4s}{}^{o,18}$; $3d^{5,3}{}_{4s}{}^{o,24}$; $3d^{5,5}{}_{4s}{}^{o,29}$

- 55o kOe : $3d^{5,o}{}_{4s}{}^{o,21}$; $3d^{5,3}{}_{4s}{}^{o,27}$; $3d^{5,5}{}_{4s}{}^{o,32}$

Vergleicht man mit Literaturwerten(189), dann ist d= 5,o recht unwahrscheinlich. Doch selbst in diesem Fall ist eine beachtlich hohe s-Dichte festzustellen. Wegen des 1o kOe niedrigeren Feldes , ist die s-Dichte bei Coprogen größer als bei Ferricrocin. Möglicherweise hängt dies mit der mesomeriefähigen C=C-Doppelbindung des Isopentenrestes von Coprogen zusammen. Auch bei Ferrichrom A , das einen

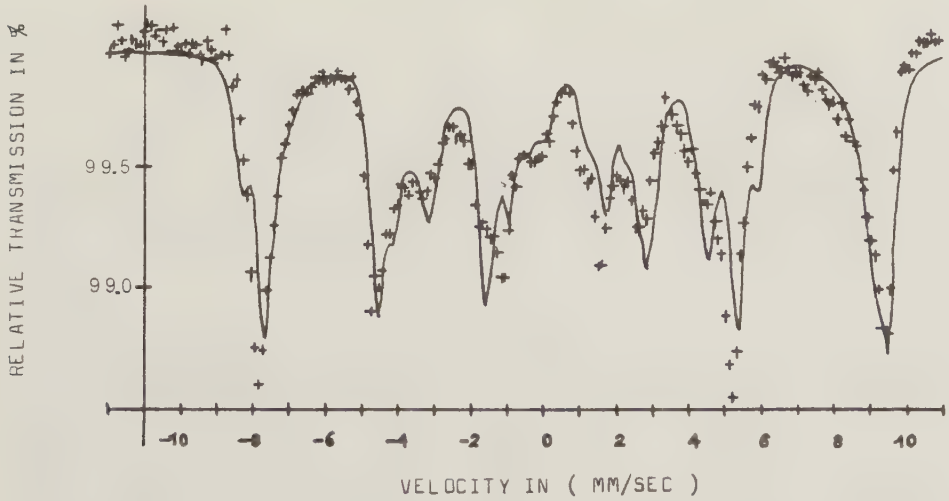


Abb. 38: Anpassung an das Spektrum von Ferricrocin bei 4,5 K und einem angelegten transversalen Magnetfeld von 1 KOe durch das Spin-Hamilton-Programm(Universität Saarbrükken) gemäß Abschnitt II.2.6. Zur Reduzierung der freien Parameter wurde A und g als isotrop angenommen, sowie $\eta = 3\lambda$ gesetzt (s.Text). Die Ergebnisse der Anpassung können der Tabelle 4 entnommen werden

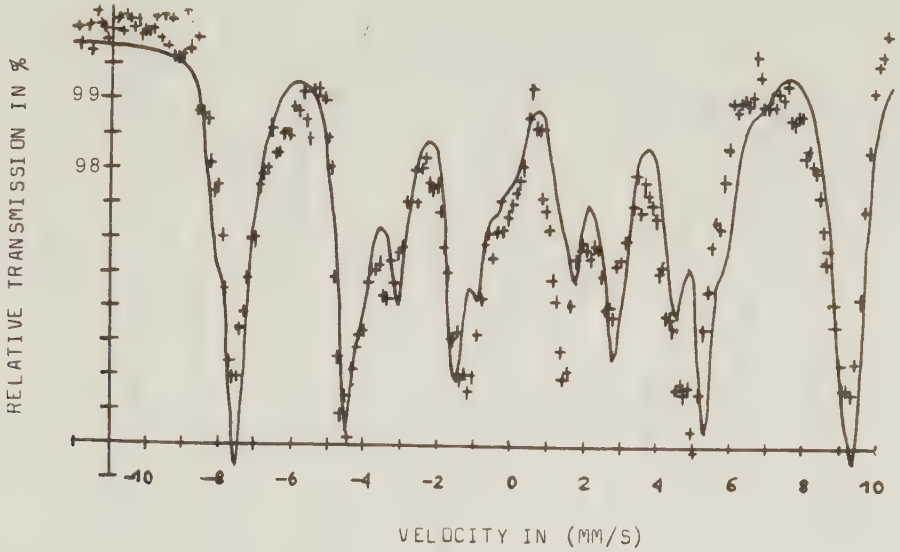


Abb. 39: Anpassung an das Spektrum von Coprogen bei 4, K und einem angelegten transversalen Magnetfeld von 1 kOe. Zu den Bedingungen der Simulation ist genaueres dem Text zu Abb.38 zu entnehmen.

ähnlichen Isopentenrest aufweist, ist die Isomerieverschiebung vergleichbar und das innere Feld gleich groß wie im Falle von Coprogen.

Da wir von einem isotropen HF-Kopplungsparameter A_o ausgehen, wird die HF-Wechselwirkung gemäß $A_o \langle \vec{S} \rangle \cdot \vec{I}$ im untersten Dublett wegen der Anisotropie von $\langle S \rangle$ entlang der y-Achse am größten sein (s. Wickman-Diagramme, Abb. 8). Es wird also ein Spektrum erzeugt, das einem starken Feld in y-Richtung entspricht. Dasselbe gilt für das oberste Dublett. Für die Spektren dieser beiden Dubletts sind große Gesamtaufspaltungen zu erwarten. Inspiziert man die albuminverdünnten 4,2 K-Spektren, so tritt das 6-Linien-Muster eines anisotropen Feldes deutlich hervor. Das 2. scharfe Subspektrum überleagert sich teilweise.

Quadrupolaufspaltung, Asymmetrie- und Rhombizitätsparameter

Die Quadrupolwechselwirkung macht sich in den Subspektren der beiden magnetisch anisotropen Dubletts in einer Shift der inneren 4 Linien relativ zu den äußeren 2 Linien des Sextetts des Dublettübergangs bemerkbar. Ist die Differenz der 2 äußeren Linien im negativen Geschwindigkeitsbereich (-8,5 mm/s - 5,5 mm/s) größer als die der 2 äußersten Linien im positiven Geschwindigkeitsbereich, ist V_{zz} mit einem negativen Vorzeichen zu versehen (^{57}Fe-Kern"prolate"). Im umgekehrten Fall ist V_{zz} positiv. Das Vorzeichen von V_{zz} ist bei der Ermittlung der Symmetrie/Isomerie nach dem Punktladungsformalismus von Bedeutung.

Gleichung (9) faßt die verschiedenen Komponenten von V_{zz} zusammen. Ferricrocin und Coprogen sind, wie der letzte Abschnitt zeigt, sehr ionische Verbindungen. Der Valenzanteil von V_{zz} kann deshalb als klein gegenüber dem Liganden-/Gitteranteil angesehen werden. Bei $\eta = 1$ ergibt sich nach dem Punktladungsmodell im Falle trigonaler Symmetrie eine trans-Isomerie (C_{2v}). Dem stehen jedoch Kristallstrukturuntersuchungen mehrerer Siderophore des Ferrichrom--Typs gegenüber, die eindeutig cis-Isomerie ergeben (s. auch IV.1.1.). η reflektiert somit - ebenso wie Δ - die Verzer-

TABELLE 4

Molekülparameter ausgesuchter Siderophore.

	Ferri-chrom	Ferri-chrysin	Ferri-crocin	Coprogen
μ_{eff} (Bohr'sche Magnetonen)	5,68 (18o)		5,72	5,72
A_o (in kOe)			-56o	-55o
in mm/sec: E_Q (Raumtemp.)	o,38	o,48	o,57	o,49
in mm/sec: E_Q (Helium)			-o,6o	-o,6o
in mm/sec: δ (Helium)			+o,65	+o,65
in mm/sec: δ (Raumtemp.)	+o,24	+o,32	+o,38	+o,4o
η		o,8o (185)	o,93	o,96
λ		o,267 (185)	o,31	o,32
log β_{11o} +)	29,1 (191)	3o,o (191)	3o,6 (192)	32,o (192)
Aufnahme(2o/uM) nmol/mg.min	o,o3	o,4	1,2	1,2
optische Isomere (in Lösung)	Λ (69)		Λ	Δ
optische Isomere (kristallin)	Λ (69)	Λ (7o)	Λ (76)	
geometr. Isomere (kristallin)	cis (69)	cis (7o)	cis (76)	
geometr. Isomere (in Lösung)				

+) $\beta_{11o} = [FeL^{3-n}] / [Fe^{3+}] \cdot [L^{n-}]$

TABELLE 5

Molekülparameter weiterer ausgesuchter Siderophore

	Ferri-chrysin	Ferri-chrom A	Ferri-rubin	Coprogen
μ(eff), (Bohr'sche Magnetonen)		5.73 (180)		5.72
A_o (in kOe)		-550 (157)		-550
(Raumtemperat.)	0.32	0.38 (157)		0.40
η	0.80 (185)	0.84 (185)	0.90 (185)	0.96
λ	0.267 (185)	0.28 (185)	0.30 (185)	0.32
log β_{110} +)	30.0 (191)	32.0 (193)		32.0 (192)
Aufnahme (20 μM) nmol/mg•min	0.4	0.04	0.03	1.2
Kompetition der Coprogenaufnahme		Hemmung	Hemmung	
optische Isomere (in Lösung)		(66)		
optische Isomere (kristallin)	(70)	(68)		
geometr. Isomere (kristallin)	cis (70)	cis (68)		?

+) $\beta_{110} = [FeL^{3-n}]/[Fe^{3+}]\cdot[L^{n-}]$

rung des Achsensystems. Für ein rhombisches Achsensystem muß jedoch der entsprechende Spinhamiltonoperator erst noch entwickelt werden, um eine Unterscheidung der jeweiligen Punktgruppen zu ermöglichen.

Auf diesem Stand der Dinge sind aus dem Asymmtrie- und Rhombizitätsparameter keine weiteren Informationen gewinnbar. Dennoch kann als Maßstab einer nicht näher definierten Verzerrung dienen und ist deshalb für die Diskussion über die Relation zwischen den molekularen Parametern und der Siderophor-Eisenaufnahme geeignet.

Bei den hier untersuchten Siderophoren ist die HF-Kopplungskonstante viel größer als die Quadrupolwechselwirkung. Die Quadrupolwechselwirkung hängt von der 2.Ableitung des Potentials in Richtung der Quantisierungsachse ab. Da $A \ll P$ ist, wird die Quantisierungsachse durch das effektive interne magnetische Feld bestimmt. Wegen der magnetischen Isotropie des mittleren Dubletts folgt der Spinerwartungswert der Richtung des angelegten Feldes. Da nun in Lösungen und Pulverabsorbern alle möglichen Orientierungen des Molekülgerüsts zur Richtung des angelegten Feldes und deshalb zu $\langle S \rangle$ auftreten, wird das Mößbauerspektrum des mittleren Dubletts verschmiert und ergibt ein unregelmäßiges Aufspaltungsbild.

IV.1.4.5. Raumtemperaturmessungen weiterer Siderophore.

Um die hier gewonnen Ergebnisse mit anderen Siderophoren vergleichen zu können - was insbesondere für die Diskussion der Rezeptorproblematik von Bedeutung ist - wurden ergänzend 2 weitere Siderophore, nämlich Ferrichrysin und Ferrichrom untersucht. Tieftemperaturmessungen zur Durchführung quantitativer Analysen waren leider nicht mehr möglich. Die 77 K - Spektren zeigen das gleiche Erscheinungsbild wie andere Siderophore des Ferrichrom-Typs(Ferricrocin, Ferrichrom A), und sind wegen der starken Relaxationseffekte einer genauen Untersuchung nicht zugänglich. So konnte lediglich Isomerieverschiebung und Quadrupolaufspaltung bei Raumtemperatur ermittelt werden, um vergleichende Betrachtungen zu ermöglichen.

Die Raumtemperatur-Spektren von Ferrichrom und Ferrichrysin (Abb.41,42) zeigen typischerweise eine "parabolisch" relaxationsverbreiterte Linie mit schwach ausgeprägter Quadrupolaufspaltung. Wie der Tabelle 4 entnommen werden kann, hat Ferrichrom im Vergleich mit seinen Analogen die kleinste Quadrupolaufspaltung. Ferrichrom besitzt im Cyclohexapeptidgerüst keine Serin-OH-Gruppe und kann deshalb als "symmetrischer" als die übrigen Siderophore der Ferrichromreihe angesehen werden.

Außerordentlich erstaunlich ist die sehr niedrige Isomerieverschiebung von Ferrichrom bei Raumtemperatur. Sie liegt am unteren Ende der Skala der Werte, die man für Fe(III) erwartet. Dieses Phänomen bedarf zu einem späteren Zeitpunkt einer genaueren Untersuchung.
Eine vollständige Analyse von Ferrichrom sollte auf der Grundlage der vorliegenden Daten eine geringere Verzerrung λ und ein beträchtlich kleineres HF-Feld erbringen.

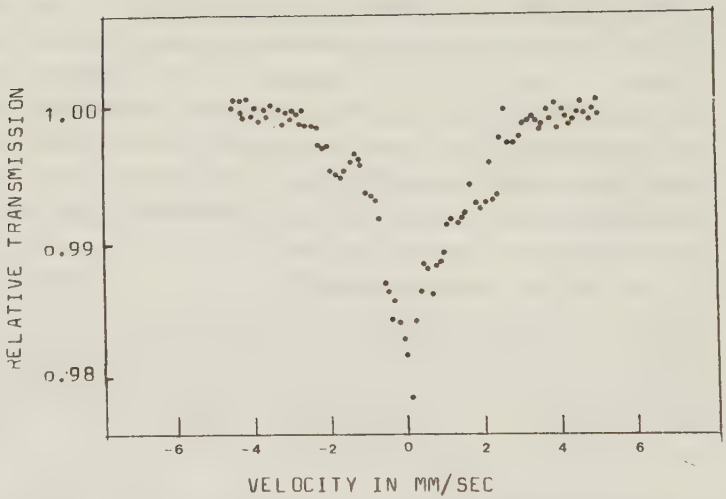


Abb. 41: Mößbauerspektrum von Ferrichrysin in unverdünntem Zustand bei Raumtemperatur.

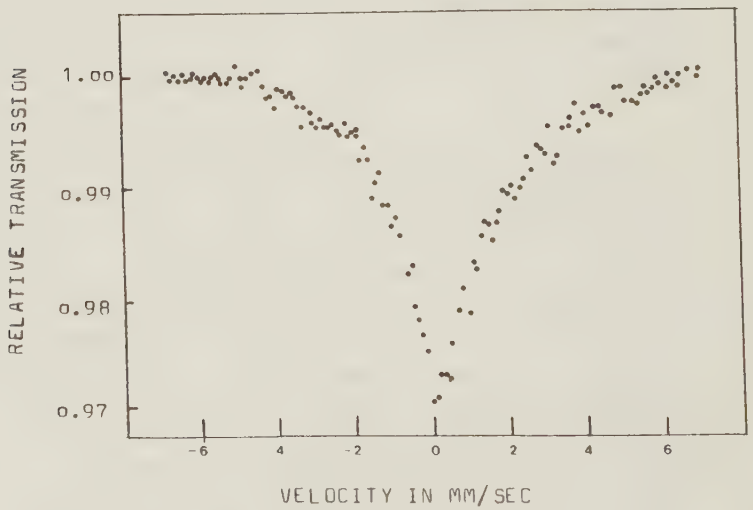


Abb. 42: Ferrichrom, bei Raumtemperatur ohne Magnetfeld gemessen.

IV.2. UNTERSUCHUNGEN ZUM VERLAUF DER SIDEROPHOR-EISEN--AUFNAHME BEI N.CRASSA.

IV.2.1. ^{55}Fe-Siderophor-Aufnahme.

Die ^{55}Fe-Label-Messungen sind vor allem deshalb durchgeführt worden, um Adsorptions- bzw. Aufnahmeraten sowie deren zeitlichen Verlauf mit den mößbauerspektroskopischen Ergebnissen korrelieren zu können. Die vergleichende Aufnahme der unterschiedlichen Siderophore im Sättigungsbereich wird im Zusammenhang mit den mößbauerspektroskopischen Parametern und schon durchgeführten kinetischen Experimenten für die Diskussion der Rezeptoreigenschaften von Bedeutung sein (s.V.1.).

In Abb.43 zeigt die Coprogenaufnahme durch N.crassa über einen Zeitraum von 2 Stunden. Die Aufnahme erfolgt nicht in Form einer Diffusionsgeraden, sondern stufenweise. Da bei bisherigen Langzeitmessungen in größeren Zeitintervallen gemessen wurde,blieb dieser Aspekt verborgen. Er wird im Zusammenhang mit Energetisierungsmodellen des aktiven Transports dikutiert werden. Weiterhin kann man dem Diagramm entnehmen, daß eine starke Akkumulation des Siderophors durch die Zelle erfolgt. Das Abknicken der Aufnahme nach etwa 1,5 Stunden hängt mit der Erschöpfung der Siderophorquelle im Medium zusammen.

In Abb. 44 ist vergleichend die zeitabhängige Aufnahme unterschiedlicher Siderophore im Sättigungsbereich (2o μM) dargestellt. Coprogen und Ferricrocin weisen vergleichbare Aufnahmeraten, Ferrichrysin ergibt eine,um etwa 5o% geringere Aufnahme. Ferrichrom und Ferrirubin werden praktisch nicht aufgenommen. Dasselbe gilt für Ferrichrom A nach (88). Wie den Abb. 1 und 2 entnommen werden kann, sind bis auf Coprogen alle genannten Siderophore dem Ferrichrom-Typ zuzuordnen. Die Unterschiede dieser Siderophore liegen in Seryl-Resten des Cyclohexapeptidgerüsts und in den Resten am Hydroxamat-Kohlenstoff. Es wird daher in der Diskussion überprüft, wie die strukturellen Differenzen mit den Mößbauerdaten korrelieren und andererseits Aussagen über die Mechanismen der molekularen Erkennung zulassen.

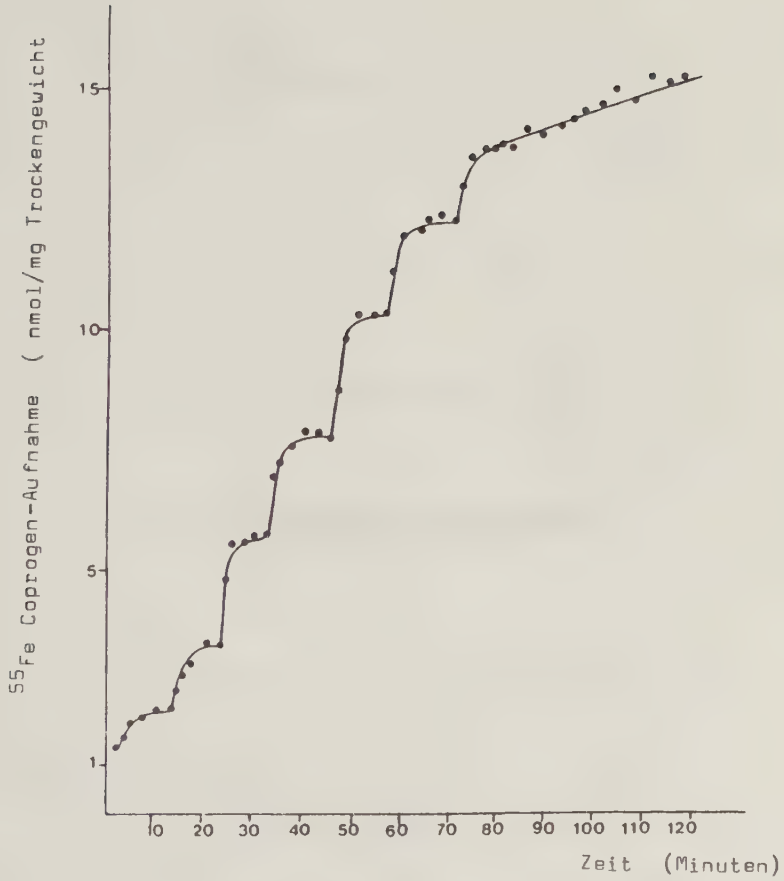


Abb. 43: Zeitabhängige Aufnahme von ^{55}Fe-Coprogen durch N. crassa 'ota'.
Zu 50 ml einer Vorkultur (Eisenmangel) von N. crassa 'ota' wurde zur Zeit t=o 50/uM ^{55}Fe-Coprogen zugegeben und bei 27°C/120 upm in der Schüttelmaschine inkubiert. In einminütigen Abständen wurde je 1 ml dieser Suspension entnommen, abfiltriert, und die aufgenommene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

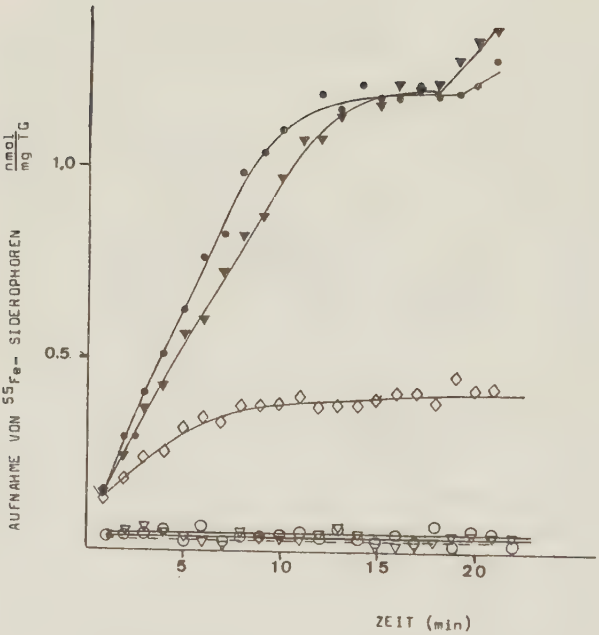


Abb. 44: Zeitabhängige Aufnahme verschiedener Siderophore durch N. crassa 'ota'.
Zu je 25 ml Vorkultur von N. crassa 'ota' (Eisenmangel) wurden verschiedene Siderophore (2o /uM) zur Zeit t=o zugegeben, und bei 27°C/12o upm inkubiert. In 1-Minuten-Abständen wurde 1 ml der Zellsuspension entnommen, abfiltriert, und die Filter mit dem Mycel im Szintillationszähler gemessen.
(●) ^{55}Fe-Coprogen ; (▽) ^{55}Fe-Ferrirubin
(▼) ^{55}Fe-Ferricrocin ; (○) ^{55}Fe-Ferrichrom
- - - FerrichromA(aus ref. 88)
(◇) ^{55}Fe - Ferrichrysin;

IV.2.2. Untersuchung des Kulturfiltrats nach Coprogen-Inkubation.

Nach 90-minütiger Inkubation von 2 l Zellsuspension mit 50 µM ^{57}Fe-Coprogen, konnte im Kulturfiltrat Coprogen weder photometrisch noch dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden. Dies bedeutet, daß nach der genannten Inkubationszeit das angebotene Coprogen vollständig adsorbiert bzw. aufgenommen ist. Das Ergebnis korreliert sehr gut mit der ^{55}Fe-Label-Messung.

Nach einer 2-stündigen Exposition ließ sich aus dem Kulturfiltrat Desferricoprogen isolieren. Da die verwendete Mutante N.crassa (arg-5,ota,aga) nicht fähig ist,ohne Ornithinzugabe Desferricoprogen zu synthetisieren, muß nach Aufnahme des Ferricoprogens zellintern eine Dekomplexierung und Wiederausscheidung der Desferriverbindung in irgend einer Form erfolgen. Das Desferricoprogen wurde nach Eisenzugabe photometrisch und nach säulenchromatographischer Isolation gravimetrisch quantitativ bestimmt. Die gefundenen 8 mg entsprechen etwa 9% der gesamten angebotenen Coprogenmenge.

Nach 4-stündiger Aufnahme waren im Kulturfiltrat 30% des angebotenen Coprogens als Desferricoprogen nachweisbar. Eine Überprüfung erfolgt durch DC und mößbauerspektroskopisch (nach ^{57}Fe-Zugabe). Das 77 K - Spektrum ist mit dem in Abb. 20 identisch. Auf der Basis dieser Ergebnisse kann vermutet werden, daß Ferricoprogen im Zellinneren außer einer Dekomplexierung keiner Veränderung ausgesetzt ist. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der folgenden Kapitel wird dieser Befund bestätigt werden.

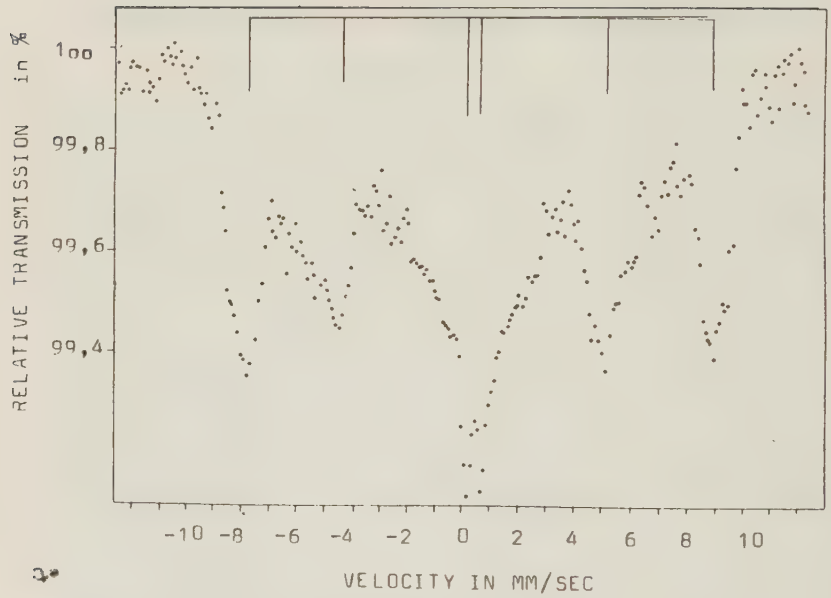


Abb. 45: Mößbauerspektrum von Zellmaterial nach 1o Minuten Coprogenaufnahme und anschließender Schockgefrierung, gemessen bei 77 K ohne externem Magnetfeld.

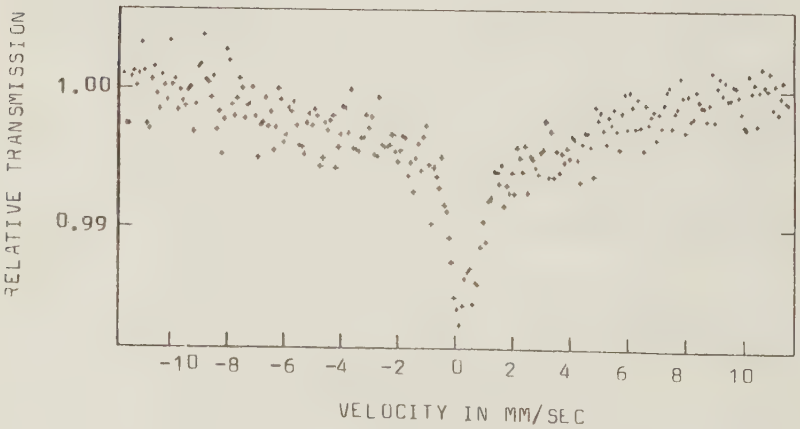


Abb. 46: Spektrum des gefriergetrockneten Zellmaterials nach 1o Minuten Coprogenaufnahme, gemessen bei Raumtemperatur.

IV.2.3. Mößbauerspektroskopische Verfolgung der ^{57}Fe-Coprogenaufnahme durch N.crassa.

Die in diesem Abschnitt dargelegten Untersuchungen demonstrieren, daß Mößbauerspektren der ^{57}Fe-Siderophoraufnahme gewonnen und aufgrund der zeitlichen Änderungen dieser Spektren, Aussagen über die Aufnahme bzw. die Verarbeitungsschritte im Zellinneren gemacht werden können.

IV.2.3.1. Coprogeninkubation von 1o Minuten Dauer.

Das 77 K Spektrum (Abb.45) ist weder mit dem Spektrum des reinen Coprogens (Abb.2o) noch mit dem in hoher Albuminverdünnung (Abb.29) konsistent. Vielmehr scheint es in gewisser Weise eine Mischung beider zu sein. Das zentrale Dublett gleicht dem des reinen Coprogens, ist aber um etwa o,o95 mm/s schmaler. Die 4 äußeren Absorptionen sind bedeutend intensiver als bei der reinen Verbindung. Bei der letzteren Verbindung verhalten sich die Intensitäten der äußeren Linien zum zentralen Dublett wie 1:4, beim 1o -Minuten-Spektrum ist dieses Verhältnis 3:4. Die Form der äußeren Linien und ihr Intensitätsverhältnis entsprechen mehr der albuminverdünnten Probe.
Aus dem Experiment können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. Nach einer Aufnahmezeit von 1o Minuten ist mößbauerspektroskopisch kein Fe(II) feststellbar. Die Coprogenaufnahme ist somit nicht reduktionskontrolliert, wie bisher vermutet wurde(19o).
2. Nach 1o-minütiger Aufnahme liegt Coprogen offensichtlich in 2 verschiedenen Umgebungen vor, die sich hinsichtlich ihres Spin-Spin-Relaxationsverhaltens unterscheiden. In der einen Mikroumgebung liegen die Eisenzentren nahe beieinander, wodurch eine Spin-Spin-Kopplung ähnlich der reinen Verbindung erzeugt wird. Die andere Umgebung entspricht dem Zustand hoher diamagnetischer Verdünnung.

Das Raumtemperatur-Spektrum (Abb.46) zeigt eine Asymmetrie des relaxierenden Dubletts wie die albuminverdünnte Pro-

be (Abb.47). Im Gegensatz zur reinen Probe (Abb.19) sind die Spektren stark verrauscht,und bieten keine zusätzlichen Aussagen.

IV.2.3.2. 2o Minuten Coprogenaufnahme.

Die Abbildung 48 bis 51 zeigen Spektren der Zellen nach 2o Minuten Aufnahme über den gesamten Temperaturbereich, sowie bei 77 K und 4,5 K mit angelegtem transversalem Magnetfeld. Das Spektrum bei Raumtemperatur zeigt ein starkes Rauschen und ist nicht sehr ergiebig. Das 77 K -Spektrum (H=o) unterscheidet sich von dem nach 1o Minuten Aufnahme im mittleren Spektrenteil. Das zentrale Dublett ist praktisch verschwunden. Vergleicht man mit albuminverdünntem Coprogen,ebenfalls mit H=o (Abb.27),so sind noch leichte Unterschiede festzustellen. Die 77 K und 4,2 K - Spektren des Zellmaterials bei angelegtem Feld (Abb. 49,51) sind im Gegensatz dazu mit den korrespondierenden Spektren des albuminverdünnten Coprogens (Abb.28,3o) identisch.
Nach 2o Minuten liegt eine einzige Spezies Coprogenmoleküle in den Spektren des Zellmaterials vor. Wie die Relaxataionen zeigen, liegen große Fe - Fe - Abstände vor, d. h. das aufgenommene Coprogen ist stark diamagnetisch verdünnt. Die Albuminverdünnung kann die Verhältnisse ausgezeichnet simulieren. Man kann daher davon ausgehen, daß zu Beginn des 2. Akkumulationszyklus (s.IV.2.1.) das von der Zelle aufgenommene Siderophor in einer relativ homogenen Verteilung vorliegt.

IV.2.3.3. Die Verhältnisse nach 3o Minuten. Fe(II).

Abb.52 gibt das Mößbauerspektrum gefriergetrockneter Zellen nach einer Coprogen-Inkubationszeit von 3o Minuten wieder. Das Spektrum entspricht dem von albuminverdünntem Coprogen. Die Intensitäten der äußeren Linien ist beim Zellmaterial nicht ganz so stark ausgeprägt wie bei der albuminverdünnten Probe. Zusätzlich erkennt man jedoch bei 2,74 mm/s einedeutig eine scharfe Linie, die typisch für Fe(III)-high-spin (bei Quadrupolauspaltung) ist. Das

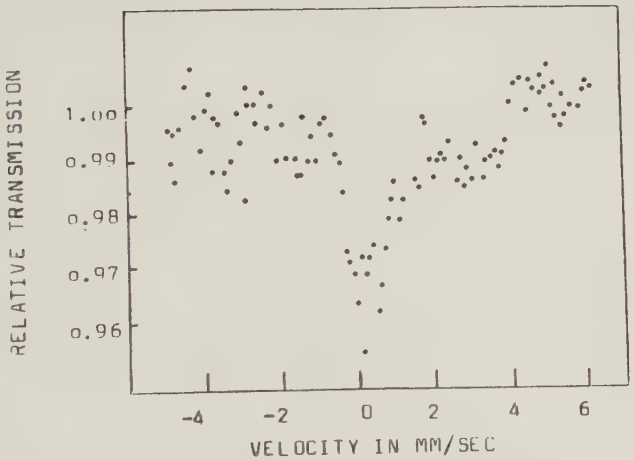


Abb. 47: Raumtemperaturmessung von albuminverdünntem Coprogen (5mg/g).

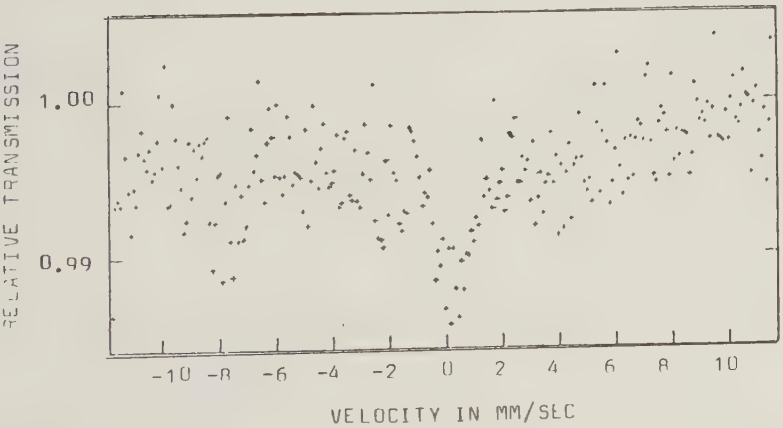


Abb. 48: Lyophilisiertes Zellmaterial nach 2o Minuten Coprogenaufnahme, gemessen bei Raumtemperatur.

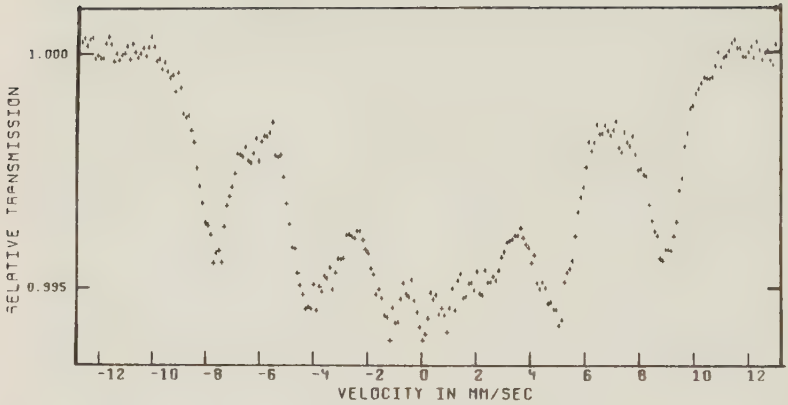


Abb. 49: 77 K - Messung der Zellen nach 2o Minuten Coprogen-Inkubation. Transversales Magnetfeld von 1KOe.

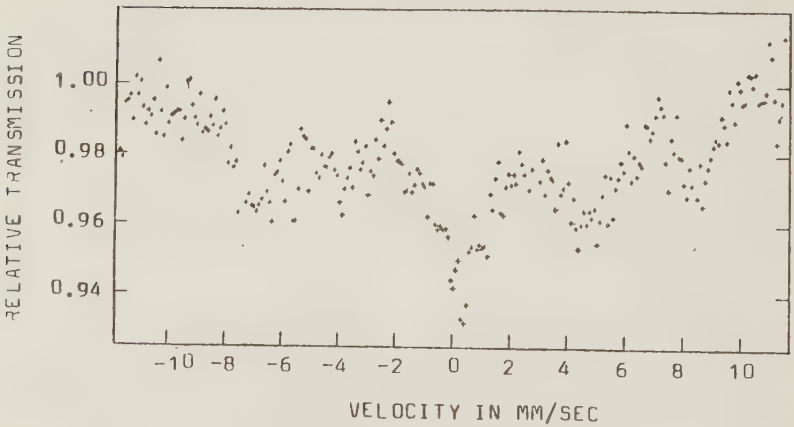


Abb. 5o: Messung gefriergetrockneter Zellen(2o Minuten Coprogenaufnahme) bei 77 K, ohne Magnetfeld.

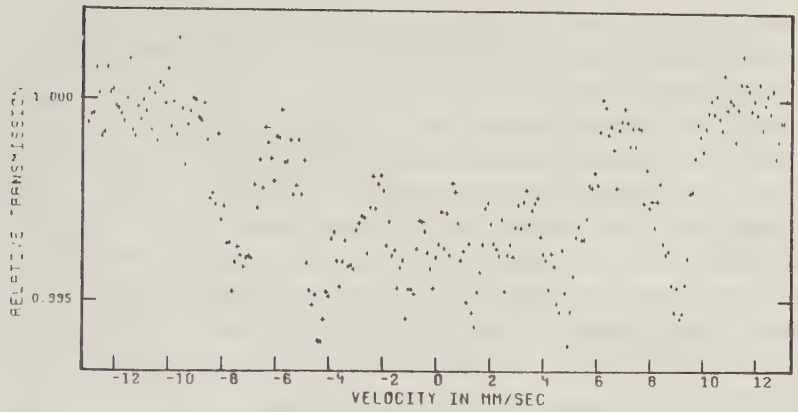


Abb. 51: MöObauermessung von gefriergetrocknetem Zellmaterial(2o Minuten Coprogeninkubation) bei 4,5 K und einem transversalen Magnetfeld von 1 kOe.

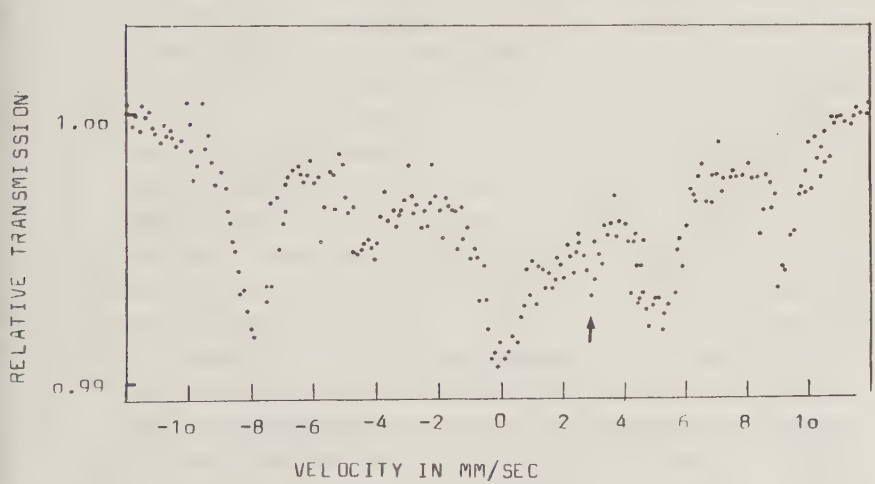


Abb. 52: Spektrum lyophilisierten Zellmaterials nach 3o Minuten Coprogen-Inkubation, gemessen bei 77 K.

Spektrum wird jedoch insgesamt durch das diamagnetisch verdünnte Fe(III)-Coprogen dominiert. Somit können 2 Aussagen gemacht werden:

1. Nach 3o Minuten Inkubation ist ein kleiner Anteil des aufgenommenenen Coprogens reduziert worden.
2. Der bei weitem überwiegende Anteil liegt als Ferricoprogen vor, und zwar in hoher Verdünnung.

Vergleicht man das Spektrum mit den Ergebnissen des folgenden Abschnitts, so zeigt sich, Daß die Albuminverdünnung hervorragend geeignet ist, einen Verdünnungseffekt zu simulieren, wie er im Cytoplasma auftritt.

IV.2.3.4. 2 Stunden Coprogen-Inkubation.

Nach 2 Stunden Exposition liefern die lyophilisierten Zellen ein Spektrum(Abb.53), das dem von reinem, unverdünntem Coprogen (Abb.2o) im gesamten Erscheinungsbild, d.h. hinsichtlich des Relaxationsverhaltens, recht ähnlich ist. Andererseits sind bedeutsame Unterschiede feststellbar:

1. Es treten 2 Absorptionen bei +1,68 und + 2,35 mm/s auf. Diese sind typisch für Fe(II)-high-spin. Interessanterweise liegen die Linien bei einer niedrigeren Isomerieverschiebung als die Fe^{2+}-Absorption des 3o-Minuten-Materials. Es handelt sich also um andere Spezies.
2. Ein Vergleich der Linie des"Zentraldubletts" bei δ = + o,7 mm/s mit der der reinen unverdünnten Verbindung ergibt, bezogen auf die linke Linie des Dubletts, bei der 2-Stunden-Probe eine signifikant höhere Intensität. Die Ursache hierfür dürfte darin zu suchen sein, daß die beiden Fe(II)-Linien typischerweise Quadrupolpaare repräsentieren, deren energetisch niedriger liegende Absorption die rechte Linie des zentralen Dubletts überlagern. Da wegen der Relaxation das Spektrum nicht gefittet werden konnte, blieb nur eine Abschätzung, die jedoch in etwa die realen Verhältnisse wiedergeben dürfte.

δ_1 = 1,o1 mm/ s , $\Delta E_{Q(1)}$ = 1,37 mm/ s

δ_2 = 1,35 mm/ s , $\Delta E_{Q(2)}$ = 2,o5 mm/s

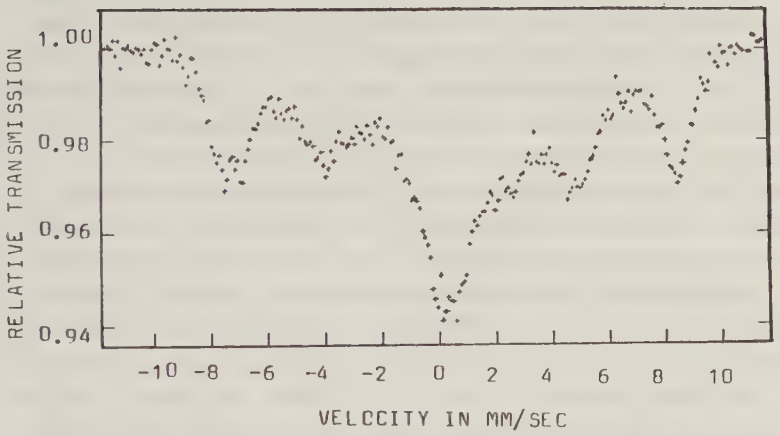


Abb. 53: Spektrum von Zellen nach 2-stündiger Coprogenaufnahme, gemessen bei 77K.

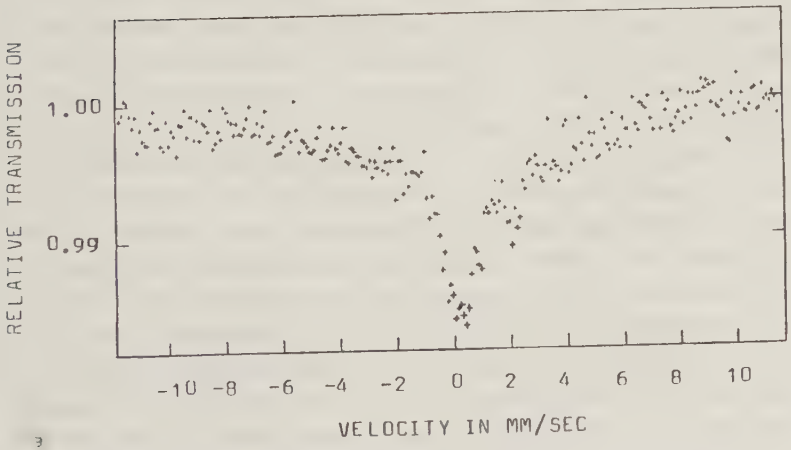


Abb. 54: Raumtemperaturspektrum von lyophilisiertem Zellmaterial nach 2 Stunden Coprogeninkubation.

Das Zellspektrum bei Raumtemperatur weist eine Fe^{2+}-Linie bei 2,o5 mm/s und eine weitere bei 1,o mm/s auf. Diese temperaturabhängige Verschiebung der Linien ist typisch für die Quadrupolaufspaltung von Fe(II)-high-spin-Verbindungen, da bei diesen Verbindungen die Vielelektronenterme Ψ_i (i=1,..5) energetisch sehr nahe beeinander liegen, und die Besetzung der Niveaus gemäß Boltzmann erfolgt.

Ferner ist die Intensität der Linien der Raumtemperatur-Messung größer als im 77 K-Spektrum (Abb.56).

Die äußeren Absorptionen haben eine höhere relative Intensität als sie bei reinem Coprogen festzustellen ist. Die Banden weisen außerdem z.T. zusätzliche Minima auf. Die höhere Intensität läßt sich dadurch erklären, daß die Spin-Spin-Relaxationszeit noch etwas niedriger als bei Coprogen liegt, was auf größere Fe-Fe-Abstände hindeutet. Sehr groß ist der Unterschied allerdings nicht mehr, wie das Intensitätsverhältnis zum"durchhängenden" zentralen Dublett zeigt.

Vergleicht man das 2-Stunden-Spektrum mit dem nach 3o Minuten Aufnahme (Abb.52), sowie mit reinem (Abb.2o) und albuminverdünntem Coprogen (Abb.29), muß man die Schlußfolgerung ziehen, daß Coprogen sich in einem Medium befindet, in dem es sich statistisch verteilt. Dabei kann es sich nur um das Cytoplasma oder ein Kompartiment des Zellinnern (z.B.Vakuolen) handeln.

In Übereinstimmung mit der stufenweisen ständigen Aufnahme (s.Abb.43) reichert sich Coprogen so stark an, daß die durchschnittlichen Fe-Fe-Abstände nach 2 Stunden sich den Werten der reinen, unverdünnten Verbindung annähern. Dies sei durch eine Abschätzung untermauert. Bei einem Feuchtgewicht der Zellen von 5 g/l Zellsuspension und einem Trockengewicht von 2g, gilt unter Vernächlässigung der Dichte, daß dieses Zellmaterial ca 3g entsprechend 3ml Wasser enthalten. Da nach 1,5 Stunden Inkubation alles angebotene Coprogen (5o/uM) von den Zellen akkumuliert wurde, liegt die Anreicherung im Bereich einer millimolaren Lösung von Coprogen - sichtbar auch anhand der Einfärbung der Zellen. In Fig.27 ist das Spektrum einer mM wäßrigen Lösung von

Coprogen abgebildet. Es zeigt die typischen spektralen Eigenschaften des reinen Coprogens, also schnelle Spin-Spin-Relaxation, sprich kleine Fe-Fe-Abstände.

Das Auftreten zusätzlicher Minima bei den äußeren Banden kann zweierlei Ursachen haben: Entweder handelt es sich um Anisotropien der Eisenkonzentration, was, wie schon erwähnt, unterschiedliche Relaxationsspezies produzieren würde, oder aber, es handelt sich um zusätzliche Strukturspezies. Im Falle der wäßrigen Lösung(Abb.27), die nur langsam abgekühlt wurde, deutet sich eine leichte Aufspaltung der äußeren Banden im Mößbauerspektrum an. Dies deutet - auch für das 2-Stunden-Spektrum - auf unterschiedliche Relaxationsspezies hin. Eine Beantwortung dieser Frage bedarf weiterer detaillierter Untersuchungen der konzentrationsabhängigen Veränderung der HF-Spektren der reinen Verbindung.

Aufgrund der Intensitätsverhältnisse und des Spektrenvergleichs kann gesagt werden, daß selbst nach 2 Stunden Inkubation noch etwa 90% des Eisens an Coprogen gebunden ist. Dies korreliert ausgezeichnet mit der Feststellung in Abschnitt IV.2.2., daß etwa 9% des angebotenen ^{57}Fe-Coprogens nach 2 Stunden Aufnahme als Desferriverbindung im Kulturfiltrat gefunden werden.

IV.2.3.5. Vierstündige Coprogen-Aufnahme.

Abb.55 zeigt das Spektrum der Zellen nach 4 Stunden Inkubation mit Coprogen, gemessen bei Raumtemperatur. Neben einer breiten Absorption mit Maximum bei δ = + 2,45 mm/s und einer weiteren bei δ = +1,91 mm/s ist eine scharfe, sehr intensive Linie bei δ = 0,61 mm/s festellbar Die nach wie vor hohe Coprogenkonzentration wird durch das typische, parabolisch durchhängende, zentrale Dublett dokumentiert, wobei die rechte Linie wieder deutlich überlagert ist. Das Spektrum weist zusätzlich Unregelmäßigkeiten auf, die jedoch wegen ihrer zu geringen Intensität nicht als weitere Eisenspezies interpretiert werden können.

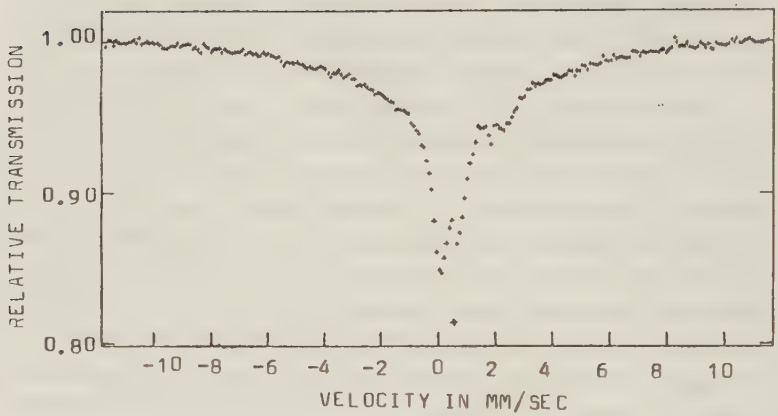


Abb. 55: Mößbauerspektrum von Zellen nach 4 Stunden Coprogenaufnahme, gemessen bei Raumtemperatur.

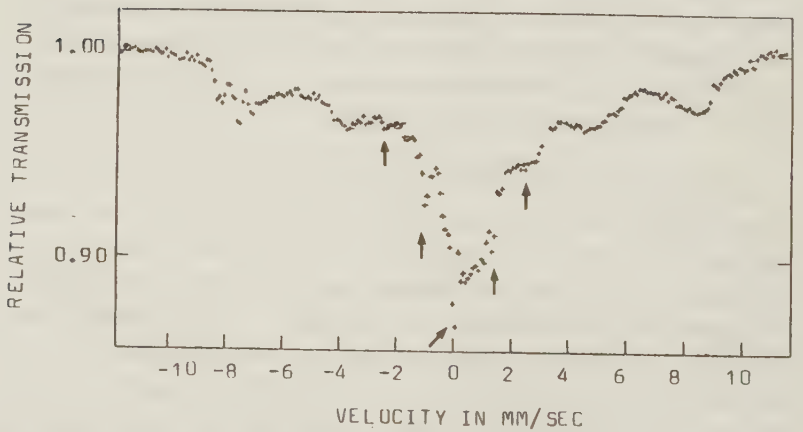


Abb. 56: Spektrum von gefriergetrocknetem Zellmaterial nach 4-stündiger Coprogenaufnahme bei 77 K gemessen.

Im 77 K - Spektrum wird deutlich, daß nach 4 Stunden das über Coprogen aufgenommene Eisen schon in beträchtlichem Umfang dem Zellmetabolismus zugeführt wurde. Neben dem Coprogen-feature sind folgende Absorptionen auszumachen:

δ_1= - 2,35 mm/s , δ_2= - 0,98 mm/s , δ_3= + 0,12 mm/s (sst)
δ_4= + 1,5 mm/s(Schulter) , δ_5= +2,4-2,8 mm/s (breite Schulter)

Im Vergleich zum 2-Stunden-Spektrum sind mindestens 3 weitere Eisen-Spezies entstanden, die möglicherweise Fe(II/III)-low-spin-Verbindungen zugeordnet werden können. Die Fe(II)-high-spin-Linien bei etwa +2mm/s sind nicht mehr so ausgeprägt, sondern breit und verwaschen. Dies kann 2 Ursachen haben; entweder haben sich eine Vielzahl von Fe(II)-Verbindungen gebildet, deren Absorptionen nahe beieinander liegen und nicht aufgelöst werden, oder aber es entstand ein neuer Komplex, der relaxiert.

Die dem Coprogen zuzuordnenden breiten Absorptionen- insbesondere im negativen Geschwindigkeitsbereich haben eine Feinstruktur. Da die Coprogen-Konzentration insgesamt genügend hoch ist (angebotene Menge: 50 µmol/l), sollte man eigentlich eine homogene Struktur des noch nicht verbrauchten Coprogen erwarten. Die im Gegensatz dazu auftretende Feinstruktur läßt sich,ebenso wie beim 2-Stunden--Spektrum, nur durch unterschiedliche Struktur- oder Relaxations-Spezies erkären. Auch hier sind detailliertere Untersuchungen nötig, um genauere Aussagen zu machen. Die Wahrscheinlichkeit von Strukturspezies ist allerdings gering, da sie im Spektralbild der Raumtemperaturmessung auftreten müßten, was nicht der Fall ist. Man kann also berechtigterweise von Relaxationsspezies ausgehen.

Aus dem Raumtemperatur-Spektrum lassen sich noch weitere Informationen erhalten. Eine Abschätzung der Absorptionsflächen läßt Rückschlüsse darauf zu, wieviel Prozent des Coprogens schon dekomplexiert sind. Etwa 65% des angebotenen Coprogens liegen demnach in noch unveränderter Form vor. Dieser Betrag stimmt größenordnungsmäßig mit der Menge an Desferricoprogen überein, die aus dem Kulturfiltrat isoliert wurde.

IV.2.4. ^{57}Fe-Ferricrocinaufnahme durch N.crassa.

Das Mößbauerspektrum gefriergetrockneter Zellen,nach 15 minütiger Inkubation mit Ferricrocin ist in Abb.57 dargestellt. Der breite parabolische Peak in der Spektren-Mitte, wie er im Falle des reinen, unverdünnten Ferricrocins beobachtet wird, kann nicht festgestellt werden. Vielmehr gleicht das Spektrum dem albuminverdünnten Ferricrocin (Abb.32). Da Spin-Spin-Relaxationsprozesse stark konzentrationsabhängig sind, läßt sich aus dem Spektrenvergleich der Schluß ziehen, daß die Ferricrocinmoleküle in starker diamagnetischer Verdünnung vorliegen. Eine Mischung unterschiedlicher Konzentrationsspezies, wie ich es bei Coprogen beobachten konnte, ist in diesem Fall auszuschließen. Allerdings befindet man sich nach 15 Minuten Akkumulation in einer Plateau-Phase (s.Abb.43), sodaß die membrangebundene Spezies eventuell nur in sehr geringer Konzentration vorliegt.

Ein Vergleich mit der Coprogen-Aufnahmecharakteristik (1o - 2o - 3o Minuten), die mit zunehmender interner Akkumulation eine starke Abnahme der Hochkonzentrationsspezies verdeutlicht - sie ist nach 3o Minuten spektroskopisch nicht mehr nachweisbar - deutet darauf hin, daß die Ferricrocinaufnahme nicht über einen Zwischenzustand höherer Mikrokonzentration läuft.

Die Spektren der Zellen nach einstündiger Ferricrocin--Aufnahme entsprechen voll denen der albuminverdünnten Proben (Abb.58,59). Bemerkenswert ist die Tatsache, daß nach einer einstündigen Aufnahme keine Absorptionen für Fe^{2+} oder anderer Fe^{3+}-Spezies feststellbar sind.

Nach 4 Stunden Ferricrocinaufnahme erhält man ein Mößbauerspektrum (Abb.6o), das einem Zustand mittlerer Spin-Spin--Relaxation entspricht. Der mittlere Spektrenteil bei $v = o$ ist breiter als er im Falle der hochkonzentrierten Proben sein dürfte. Das gesamte Spektralbild entspricht jedoch eher der Hochkonzentrationsform als der albuminverdünnten Probe: die äußeren Absorptionen sind "hochgezogen",

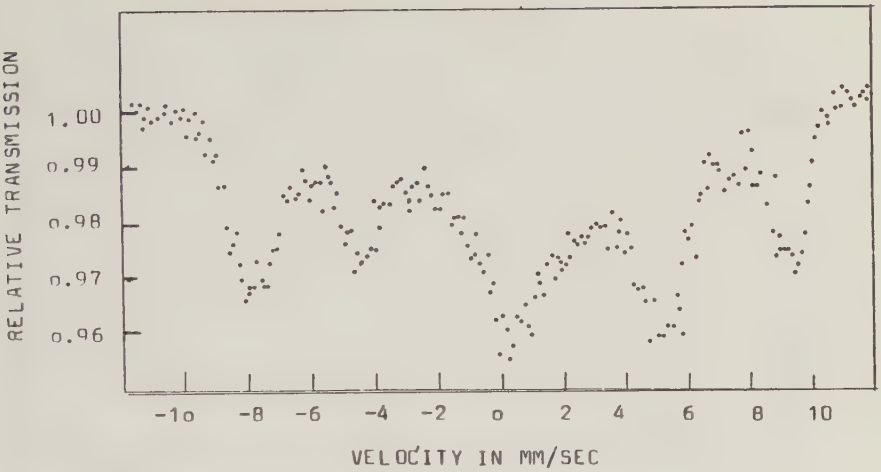


Abb. 57: Spektrum von Zellen nach 15 Minuten Ferricrocin-inkubation, bei 77 K gemessen.

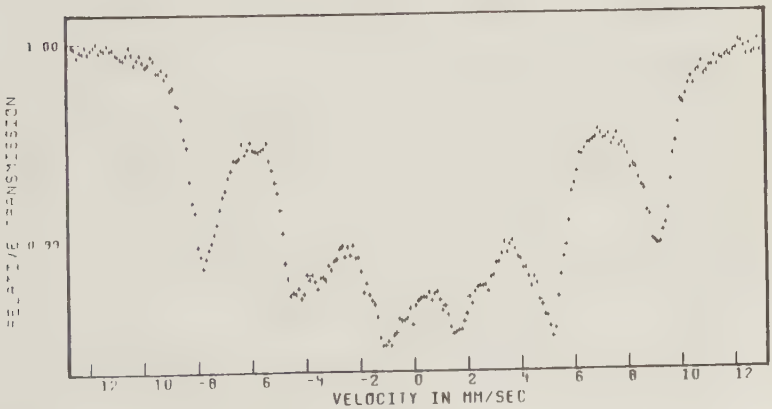


Abb. 58: 77-k-Spektrum von lyphilisierten Zellen nach einstündiger Ferricrocinaufnahme(externes Magnetfeld von 1 kOe)

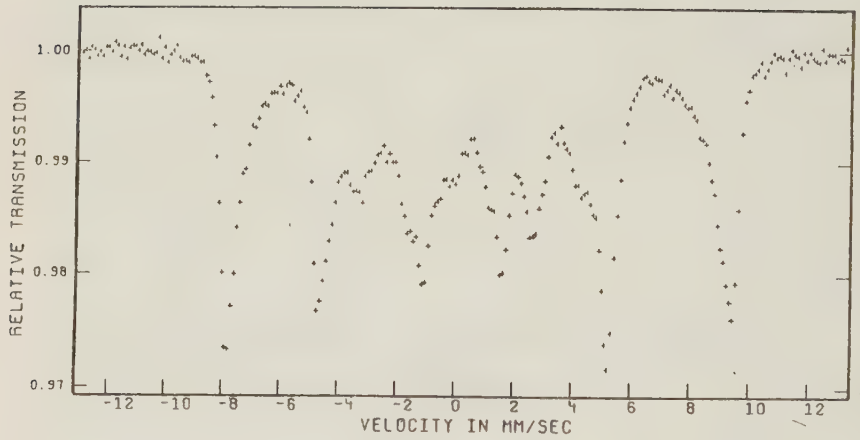


Abb. 59: Spektrum gefriergetrockneter Zellen nach einstündiger Ferricrocinaufnahme, bei 4,5 K gemessen. Externes transversales Magnetfeld von 1 kOe Stärke.

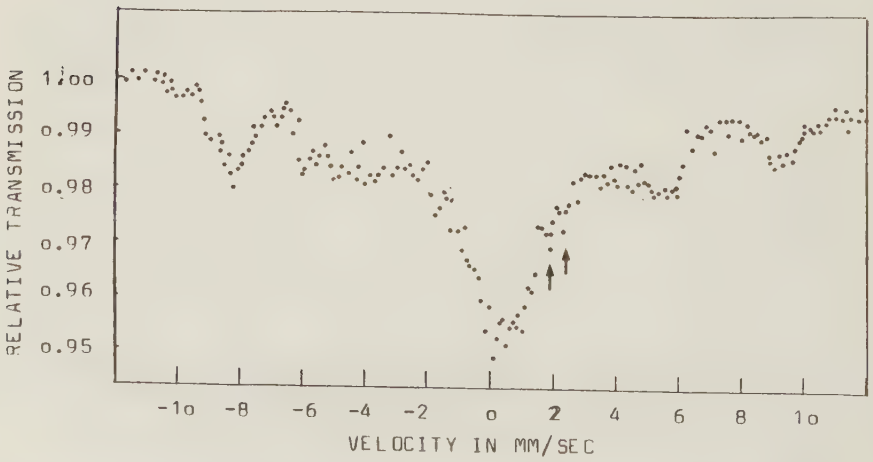


Abb. 60: Mößbauerspektrum gefriergetrockneten Zellmaterials nach vierstündiger Ferricrocin-Inkubation bei 77 K gemessen.

der mittlere Spektrenteil "hängt durch". Bei δ = + 1,76 mm/s und δ = + 2,36 mm/s sind zusätzliche Absorptionen vorhanden, die typisch für Fe(II)-high-spin sind.

Die Ergebnisse der Ferricrocinaufnahme sind höchst erstaunlich. Während Eisenmangel-Zellen von N.crassa nach 3o Minuten Coprogen-Aufnahme spektroskopisch nachweisbar Fe(II) gebildet haben, ist ein vergleichbarer Zustand bei der Ferricrocinaufnahme erst nach 4 Stunden erreicht. Zu diesem Zeitpunkt sind etwa 4% des angebotenen Eisens reduziert. Die Zellen nach vierstündiger Coprogeninkubation hingegen, haben sich im gleichen Zeitraum etwa 3o% des Eisens für den Stoffwechsel verfügbar gemacht. Dieser drastische Verwertungsunterschied läßt sich nur damit erklären, daß Ferricrocin nicht direkt für den Eisen-Metabolismus der N.crassa-Zellen in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet wird. Dies wird noch deutlicher, wenn man berücksichtigt, daß die Zellen im Eisenmangel angezogen werden, und Eisen für Stoffwechselprozesse ständig dringend benötigen.

V. DISKUSSION

V.1. DIE MOLEKULAREN PARAMETER DER SIDEROPHORE. SCHLUSSFOLGERUNGEN ÜBER DIE MECHANISMEN DER ERKENNUNG.

Zur Problematik stereoselektiver Erkennung in biologischen Systemen schreiben A.Pedro und F. Lehmann in (131) :
" Es wurden schon viele Formulierungen benutzt, um den charakteristischen Beitrag stereoselektiver Erkennung zum Mechanismus der molekularen Erkennung zu beschreiben: Komplementarität, Fit, Topo-Chemie und bei Hinderungen: Volumeneffekt, sterische Hinderung oder Interferenz etc. Im Grunde sind diese Formulierungen nichts anderes als eine Bemäntelung unseres Unwissens der tatsächlichen Abläufe."
Dies sei Ansporn, um in der folgenden Diskussion, wenn auch nur in einer ganz speziellen Fragestellung, ein paar Mosaiksteine in diesem unendlichen Puzzle zusammenzutragen.

Zum vollständigen Verständnis der Natur der Rezeptor-Chelatkomplexe müssen drei unterschiedliche, aber eng miteinander verknüpfte Aspekte berücksichtigt werden (132):

- Struktur
- energetische Verhältnisse
- Zeitabhängigkeit (Dynamik, Kinetik)

Ein sinnvolles Verständnis biologischer Spezifität erfordert die Formulierung der notwendigen Relationen zwischen allen 3 Aspekten.

Im idealen Fall (einzelne Bindungsstelle, hohe Affinität, Gleichgewichtsbedingungen) kann die spezifische Bindung auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes formuliert werden.

$$Che + Re \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} Che \,.\, Re \quad ; \quad k_A = \frac{k_1}{k_{-1}} = \frac{[Che.Re]}{[Che]\,[Re]} \,.\, M^{-1}$$

Bei enzymatischen Reaktionen und den hier untersuchten Transportprozessen wird die Michaelis-Menten Konstante K_M benutzt. $1/K_M$ ist K_A äquivalent, jedoch keine Gleichgewichts-, sondern eine steady state -Konstante. In realen biologischen

Systemen ist die ideale Situation nur äußerst selten verwirklicht. Da der Adsorptions-und Aufnahmeprozeß in eine Vielzahl von Teilprozessen zerfallen kann, müssen die ermittelten Konstanten als komplexe, zusammengesetzte Größen betrachtet werden. Die kinetischen Ergebnisse können also nur in einer qualitativen Weise interpretiert werden.

Aus den in dieser Arbeit gewonnenen strukturellen Parametern und aus einem Vergleich mit schon ermittelten Daten lassen sich deutliche Trendlinien herausarbeiten und diese mit den ^{55}Fe-Labelmessungen korrelieren. Dies soll in den folgenden Abschnitten detaillierter erörtert werden. Zunächst sind jedoch einige Anmerkungen über die energetischen Zusammenhänge zu machen, die allerdings wegen des mangelnden Faktenmaterials einen eher allgemeinen bzw. spekulativen Charakter tragen.

V.1.1. Energetische Überlegungen

Um die Effekte, die durch einzelne Molekülgruppen verursacht werden, in etwa abschätzen zu können, ist ein Wissen darüber notwendig, welche energetischen Verhältnisse durch einzelne Wechselwirkungstypen produziert werden, sowie, welche Reichweite die jeweiligen Kräfte haben. Diese Wechselwirkungen können sein:

- elektrostatische (Ionen, Multipole)
- Wasserstoffbrückenbindungen
- van der Waals
- charge transfer

Die Wechselwirkungsenergie ΔE kann als eine Summe verschiedener Beiträge betrachtet werden. Die wichtigsten Anteile sind die Coulomb-Energie (E_C), die Induktionsenergie (E_I), die Dispersions- (E_D), die charge transfer- (E_{CT}) und die Austausch-Abstoßungsenergie (E_{AA}) (133).

$$\Delta E = E_C + E_I + E_D + E_{CT} + E_{AA}$$

Wechselwirkungs-Energie zwischen permanenten Multipolen: Coulomb Energie, E^C	
Ion-Ion	$-\frac{q_R q_R}{r}\ \frac{1}{4\pi\epsilon_o}$
Dipol-Dipol	$-\frac{\text{const.}\ \mu_R \mu_T}{r^3}\ \frac{1}{4\pi\epsilon_o}$
Quadrupol-Quadrupol	$\frac{\text{const.}\ Q_R Q_T}{r^5}\ \frac{1}{4\pi\epsilon_o}$

Wechselwirkung zwischen einem permanenten Multipol und einem Induzierten Multipol: Induktionsenergie E^I	
Ioneninduzierter Dipol	$-\frac{1}{2r^4}\ q_R^2\,\alpha_T$
Dipol-induzierter Dipol	$\text{const.}\left[-\frac{1}{2r^6}\ \mu_R^2\,\alpha_T\right]$

Wechselwirkung zwischen einem temporären Dipol und einem induzierten Dipol: Dispersions-Energie: E^D
$\frac{\text{const.}\ \alpha_R \alpha_T}{r^6}$

Tabelle 6

Entfernungsabhängigkeit elektrischer Wechselwirkungen.

Die anziehenden und abstoßenden Kräfte, die zwischen den Multipolen wirken, sind nur in kugelsymmetrischen Systemen isotrop. In komplexeren Systemen ist die Wechselwirkungsenergie eine Funktion der gegenseitigen Orientierung der wechselwirkenden Multipole. Je höhergradig die beteiligten Multipole sind, desto geringer ist die Wechselwirkungsenergie. Die Induktionsenergie hängt von der Größe des permanenten Multipols und der Polarisierbarkeit des komplementären Systems ab. Die Dispersionsenergie ist letztendlich nur auf quantenmechanischer Basis erklärbar. Aufgrund der Schwingungen der Atomkerne und Elektronen treten auch in kugelsymmetrischen Systemen temporäre Multipole auf. Der Wert ist durch die momentane Position der Kerne und Elektronen gegeben und variiert mit der Zeit. Der Mittelwert über alle Positionen ist Null.

Nach (134) können für die Bildungswärmen von schwachen intermolekularen Bindungen größenordnungsmäßig folgende Werte angegeben werden:
Stabilisierungsenergie für H-Brückenbindung 2-5 kcal / Mol; H-Brücken oder ionische Bindung zwischen geladenen Gruppen 1o kcal / Mol und kleiner; hydrophobe Wechselwirkung ~1,5 kcal / Mol.

Der Tabelle 6 kann qualitativ die Entfernungsabhängigkeit der jeweiligen Wechselwirkungsenergien entnommen werden. Sowohl für die Multipolwechselwirkung höheren Grades als auch für die Dispersionskräfte ergibt sich ein viel rascherer Abfall mit der Entfernung als bei Dipol-Dipol- oder gar ionischen Kräften. Wenn als Reichweite der zwischenmolekularen Kräfte diejenige Entfernung definiert wird, bei der die Wechselwirkungsenergie zweier Moleküle bis auf den Betrag der mittleren Energie der thermischen Molekularbewegung (etwa o,9 kcal/ Mol) abgefallen ist, so betragen bei kleinen Molekülen die mittleren Reichweiten für die Dispersionskräfte 4 Å, während der Dipol-Dipol-Richteffekt bis 6 Å reicht. Größere Reichweiten als 1o Å treten nur unter Ionenbeteiligung auf (135). Wenn auch die absoluten Werte je nach Pola-

risierbarkeit, Dipolmoment und Größe der Moleküle schwanken, kann doch das Verhältnis der Reichweiten in vergleichbaren Systemen als repräsentativ angesehen werden. Ionische und in geringerem Maße auch Dipolkräfte haben demnach sowohl die größte Reichweite als auch die größte Bindungsenergie, sofern man kooperative Effekte unberücksichtigt läßt.

Aufgrund von Röntgenstrukturanalysen verschiedener Hydroxamatsiderophore (68-70) und auf der Basis eines Kalottenmodells von Coprogen kann gesagt werden, daß alle in dieser Arbeit behandelten Siderophore das Eisen leicht zugänglich an der Peripherie des Moleküls komplexieren (s.Abb 61). Die Ladungskompensation des Fe^{3+} erfolgt durch 3 negativ geladene Sauerstoffatome der Hydroxylamingruppen. Eine Delokalisation der Ladung über die gesamte Hydroxamatgruppe ist kaum möglich. Da nun die Ferrichrome cis-Anordnungen am Eisen-Sauerstoffoktaeder ausbilden (s. Abschn.II.), sind die negativ geladenen Sauerstoffatome wegen der facialen Anordnung auf einer Oktaederfläche konzentriert. Es handelt sich dabei um die dem Molekülgerüst zugewandte Fläche.

Aufgrund der Raumwirkung elektrischer Ladungen und der asymmetrischen Ladungsverteilung am Fe-O-Oktaeder müssen Coulomb-Wechselwirkungen bei der folgenden Diskussion besonders berücksichtigt werden. Zumindest im Prozeß der Annäherung an den Rezeptor müssen diese Kräfte wegen ihrer relativ großen Reichweite eine Rolle spielen. Als Sonde für die Verhältnisse in der Elektronenhülle des Eisens dienen die Isomerieverschiebung δ , der Rhombizitätsparameter λ und die Komplexbildungskonstanten (s. Tabelle4 + 5).

V.1.2. Die Wirkung einzelner Molekülgruppen auf die Molekülparameter und die Aufnahme durch N.crassa

Die hohe Selektivität, die gewöhnlich in natürlichen Systemen beobachtet wird, beruht auf einer optimalen Komplementarität zwischen Substrat und Rezeptor, die sich im Laufe der Evolution herausgebildet hat und an der eine minimale Anzahl von Wechselwirkungen beteiligt sind, d.h. auf einer allgemeinen "Schloß-Schlüssel"-Beziehung, die nicht auf sterisches Ineinanderpassen beschränkt ist, sondern sich auf ein ganzes Spektrum molekularer Eigenschaften bezieht.

Die Wirkung der Wechselwirkung kann sich nur dann maximal entfalten, wenn maximaler Kontakt zwischen Substrat und Rezeptor existiert. Dieser maximale Kontakt erfordert ein hohes Maß an Komplementarität der Gesamtstruktur (136). Durch räumliche Anordnung der Erkennungsstellen in einer Höhle oder einer Spalte des Rezeptors läßt sich auf ihm der größtmögliche Informationsgehalt für den Erkennungsvorgang unterbringen. Die Erkennungsstellen selbst sind polare oder nichtpolare Atomanordnungen, die als Bindungs-oder Verankerungsstellen fungieren. Eine Feinabstimmung dieser Zentren ist aufgrund der weiten Palette der elektronischen Eigenschaften, der Zahl, Größe, Anordnung usw. der beteiligten Atome möglich (137): Konformation, Stereo-, Cyclostereo-, cis/trans-Isomerie, absolute Konfiguration resp. Chiralität (138-140).

Die Siderophore der Ferrichromreihe sind sich alle sehr ähnlich. Ein Cyclohexapeptidring stellt das Grundgerüst des Moleküls dar. Unterscheidungen im Peptidring selbst existieren nicht. Lediglich die Substitution des Glycin durch Serin bewirkt das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein peripherer CH_2OH - Gruppen: Ferrichrom besitzt keine, Ferricrocin eine, Ferrichrysin zwei. Die vom Ferrichrysin abgeleiteten Siderophore Ferrichrom A und Ferrirubin unterscheiden sich von ihrem Stammkörper durch Isopentensäure-bzw. Isopentenolreste am Hydroxamatkohlenstoff. Bis auf den Isopentenolrest, der auch bei der Biosynthese der Terpene und Steroide als Zwischen-

stufe auftritt, unterscheidet sich Coprogen strukturell stark von den Siderophoren der Ferrichromreihe. Neben Coprogen werden von N.crassa auch Siderophore der Ferrichromreihe aufgenommen. Die Struktur-Aufnahme-bezogenen Zusammenhänge sollen nun genauer untersucht werden.

V.1.2.1. Seringruppen - Wirkung auf das Eisenzentrum und Siderophoraufnahme durch N.crassa.

Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, nimmt die Isomerieverschiebung in der Reihe Ferrichrom - Ferrichrysin - Ferricrocin zu. Den gleichen Trend zeigen die Komplexbildungskonstanten. Zwar ist der Rhombizitätsparameter von Ferrichrom noch nicht ermittelt, aus der Quadrupolaufspaltung bei Raumtemperatur (s. Tabelle 4) kann jedoch geschlossen werden, daß Ferrichrom den niedrigsten Wert für λ in dieser Reihe hat. Die Verzerrung des Fe-O-Oktaeders, die Elektronendichte und damit zusammenhängend die Komplexbildungskonstante nehmen in Richtung Ferricrocin zu.

Es ist zunächst außerordentlich erstaunlich, daß eine, bzw. zwei periphere CH_2OH-Gruppen, die zudem noch weit vom Eisenzentrum entfernt sind (12 Atome), solche drastischen Veränderungen der Eigenschaften des Eisen-Sauerstoff-Oktaeders verursachen können. Dieser long range Effekt kann nur über eine Veränderung transannularer H - Brückenbindungen des Peptidteils erklärt werden.

Auf der Basis der Kristallstruktur von Ferrichrom A (68), Ferrichrysin (70) und Ferrichrom (69) und im wesentlichen auch durch NMR - Untersuchungen von Ferrichrom, Ferricrocin und Ferrichrysin in Lösung (141-143) binden die 3 Ornithylreste kugelförmig das Fe - Ion, während das Cyclohexapeptidgerüst eine verzerrte, antiparallele β - Faltblattstruktur aufweist. Der Abstand von 2,99 Å zwischen Gly^3O und Orn^3N (s.II.) im Ring repräsentiert eine mittelstarke, transannulare H - Brücke.

Unter Verwendung der Tritium-Austauschtechnik konnte experimentell gefunden werden, daß 4 der 6 Peptid - H - Atome des Rings sich nur sehr langsam austauschen (144), mit Halb-

wertszeiten von mehreren Stunden. Weder Cyclo (Ala-Ala-Gly-Ala-Gly-Gly) noch Desferriferrichrom A zeigen solche Eigenschaften. Der langsame H - Austausch resultiert aus einer starken Abschirmung infolge der veränderten Konformation durch die Eisenkomplexierung. Aufgrund der NMR - Messungen wurde für Ferrichrysin und Ferrichrom A noch eine weitere transannulare H - Bindung festgestellt (143). Die $^{1}H - ^{2}H$ - Austauschraten der 3 Ornithin-Peptidwasserstoffatome verlangsamen sich in der Reihenfolge Ferrichrom-Ferricrocin - Ferrichrysin auf 1/3 bzw. fast 1/1o. Wie neuere Untersuchungen mit ^{13}C - NMR zeigen, ist der Konformationswechsel durch Komplexierung drastisch, ein Effekt durch Substitution des Gly durch Ser jedoch nur sehr schwach ausgeprägt (145), sodaß man davon ausgehen kann, daß das Peptidgerüst kaum Änderungen hierdurch erfährt. Die periphere CH_2OH - Gruppe muß daher über H - Brückenbindungen, ohne wesentliche Beeinflussung des Peptidrings auf das Fe - Zentrum - möglicherweise über eine zusätzliche H - Brücke $^{\alpha}N$ -Orn^{i} - $^{\delta}N$ - Orn^{i}-Sauerstoff - wirken.

Dieser long-range-Effekt macht sich am Eisen in zweierlei Weise bemerkbar:

1. Die mit Hilfe des Rhombizitätsparameters λ gemessene Verzerrung des Eisen - Sauerstoff - Oktaeders nimmt durch die Serinreste zu. Das strukturell anders aufgebaute Coprogen zeigt in dieser Reihe die größte Verzerrung.
2. Geht man von einem vergleichbar großen Fermi - Kontaktfeld bei diesen Siderophoren aus, dann bedeutet die beobachtete Verlagerung der Isomerieverschiebung in Richtung positiverer Werte eine größere Elektronendichte in der Elektronenhülle von Fe^{3+}.

Die höhere Elektronendichte am Eisen erklärt auch die Zunahme der Komplexbildungskonstanten.

Die Parameter λ , δ und β_{11o} nehmen allerdings nicht in der Reihenfolge Ferrichrom - Ferricrocin - Ferrichrysin zu, wie aus den $^{1}H - ^{2}H$ - Austauschmessungen zu schließen wäre. Vielmehr scheint die 2_{1}, bei Al - Desferriferrichrysin und Al - Desferriferrichrom A gefundene transannulare H -Brücke

den bei Ferricrocin auftretenden Effekt bzgl. Symmetrie und Elektronenverteilung teilweise wieder zu kompensieren. Der Sprung der Komplexbildungskonstanten und der Isomerieverschiebung von Ferricrocin nach Coprogen kann nicht im Rahmen der homologen Ferrichromreihe erklärt werden. Möglicherweise bewirkt die Doppelbindung der 2 Isopentenol - Reste bei Coprogen über einen Mesomerieeffekt eine Elektronendelokalisation und damit eine höhere Elektronendichte der Eisenhülle sowie eine weitere Stabilisierung des Komplexsystems.

Vergleicht man die ermittelten Parameter mit den Aufnahmekinetiken, so stellt man fest, daß Ferricrocin und Coprogen im Sättigungsbereich sehr hohe Aufnahmeraten zeigen, obwohl sie strukturell außer der für alle Fe - Siderophorkomplexe typischen peripheren Eisenlage keine Gemeinsamkeiten zeigen. Ferrichrysin, das sich vom Ferricrocin lediglich durch eine CH_2OH - Gruppe unterscheidet, hat jedoch deutlich niedrigere Aufnahmeraten im Sättigungsbereich ($\sim 40\%$), während Ferrichrom praktisch nicht aufgenommen wird. Ein Pendant zur Seringruppe und zum Cyclohexapeptidgerüst existiert bei Coprogen nicht. Hinsichtlich der elektronischen Verhältnisse der Fe - Hülle, als auch bzgl. der Verzerrung des Fe - O - Oktaeders steht Ferricrocin dem Coprogen jedoch näher als den 2 übrigen Siderophoren der Ferrichromreihe. Es läßt sich also der Schluß ziehen, daß die Eisenregion eine wesentliche Rolle bei Erkennung und / oder Transport der Siderophore spielt.

Ein weiterer experimenteller Befund bestätigt dies. Semisynthetische Coprogenderivate wie N - Propionyl- und N - Butyryl - Coprogen B, Verbindungen, bei denen der Acetylrest am esterverknüpften Ornithin substituiert wurde, zeigen keine Abnahme der Transportraten. Dieser Effekt wird erst bei Verwendung noch längerer Reste beobachtet. Da bei Coprogen ein long range - Effekt über H - Brücken wie in der Ferrichromreihe nicht möglich ist, können diese Reste auch kaum die elektronischen Verhältnisse des Fe - Zentrums beeinflussen. Die Abnahme der Aufnahmeraten bei größeren Kettenlängen

läßt sich in diesem Zusammenhang durch sterische Hinderung erklären.

Diese Resultate stehen in guter Übereinstimmung mit Untersuchungen von Hansch (146,147), der nach einer rechnerisch durchgeführten Regressionsanalyse hunderter chemo - biologischer Wechselwirkungen die relative Wichtigkeit jedes der beitragenden Parameter einordnen konnte. Die biologische Aktivität (BA) einer Verbindung in einem Satz vergleichbarer Verbindungen wird durch den negativen Logarithmus der Konzentration C beschrieben, die einen bestimmten Effekt bewirkt. Diese Effektkonzentration wird durch ein Ensemble von Parametern verursacht, die sich linear überlagern:

$$BA = \log 1/C = - \log C = \sum a(\pi_i) + b(\sigma_i) + c(S_i) + d$$

wobei π = hydrophobe, σ = elektronische, S = Volumen- und d = sonstige Effekte des Molekülteils i bedeuten. Die Hansch 'schen Berechnungen ergaben, daß die hydrophobe und die elektronische Wechselwirkung dominieren, während die andern Effekte nur eine geringere Rolle spielen.

Wegen der starken strukturellen Unterschiede zwischen Coprogen und Ferricrocin bleibt allerdings die Frage offen, ob der Rezeptor lediglich auf die elektronischen Verhältnisse am Eisenzentrum reagiert. Handelt es sich um ein einziges, gemeinsames Rezeptorsystem, wäre dies die allein mögliche Erklärung für die hier referierten experimentellen Beobachtungen. Zwar kann eine Inhibition der Coprogenaufnahme durch Siderophore der Ferrichromreihe und umgekehrt festgestellt werden (88), doch waren bei diesen Untersuchungen die Inhibitorkonzentrationen 3 - 1o mal höher als die des Substrats. Aussagen über eine echte Kompetition - also Konkurrenz um einen Rezeptortyp - können jedoch nur bei etwa gleich großen Substrat- und Inhibitorkonzentrationen gewonnen werden. Obwohl die elektronischen Verhältnisse am Fe - Zentrum eine wichtige Rolle bei der Erkennung spielen, bleibt bei diesem Stand der Diskussion die Frage unbeantwortet, ob es für die Ferrichromreihe und Coprogen ein gemeinsames oder zwei unterschiedliche Rezeptorsysteme gibt (s. jedoch folgende Kapitel).

V.1.2.2. Reste an Hydroxamatgruppen - Wirkung auf das Eisenzentrum und die Aufnahmekinetik bei N.crassa

In Tabelle 5 sind die molekularen Parameter der Reihe Ferrichrysin - Ferrichrom A - Ferrirubin und zum Vergleich Coprogen wiedergegeben. Obwohl die Daten für Ferrirubin nicht komplett sind, können aus den strukturellen Ähnlichkeiten, sowie aus einem Vergleich mit den Trends in Tabelle 4 , geschlossen werden, daß die Isomerieverschiebung δ einen ähnlich hohen, wenn nicht noch größeren Wert aufweist. Das selbe kann für die Komplexbildungskonstante angenommen werden.

Auch in dieser Reihe werden wieder drastische Veränderungen der Isomerieverschiebung, der Elektronendichte der Fe - Hülle also, der Verzerrung des Eisen - Sauerstoffoktaeders und der Komplexbildungskonstanten deutlich. Die Wirkung auf das Eisenzentrum kann hier jedoch nicht über das Peptidgerüst erfolgen. Vielmehr haben die Isopentenreste auf den Chelatkomplex einen direkten Einfluß, weil sie vom Hydroxamatkohlenstoff abgehen. Komplexbildungskonstante und Isomerieverschiebung von Ferrichrom A sind in etwa gleich groß wie die Werte für Coprogen. Das selbe kann für Ferrirubin angenommen werden. Die Isoprenreste haben also - vergleicht man mit dem Stammkörper Ferrichrysin - einen großen Einfluß sowohl auf Symmetrie als auch Elektronendichte am Eisen. Sowohl Coprogen als auch Ferrichrom A und Ferrirubin haben Isopentenreste, deren Doppelbindung in Konjugation zur Carboxylgruppe steht. Über Mesomerieeffekte kann deshalb die Elektronendichte am Carboxylsauerstoff und in der Elektronenhülle des Eisens erhöht werden. Die hohen Werte für die Isomerieverschiebung und Komplexbildungskonstante sind zumindest zum Teil durch einen solchen Resonanzeffekt erklärbar. Die Isopentenreste beeinflussen also den das Eisen komplexierenden Molekülteil der Siderophore der Ferrichromreihe. Wie aus NMR-Untersuchungen hervorgeht,werden durch diese Reste im Peptidring im Vergleich zu Ferrichrysin keine großen Änderungen beobachtet (143, 145).

Aufgrund der ermittelten Werte für die Molekülparameter sollte man erwarten, daß Ferrichrom A und Ferrirubin ebenso gut von N.crassa aufgenommen werden wie Coprogen und Ferricrocin. Im Gegensatz dazu steht jedoch der experimentelle Befund, daß eine nennenswerte Aufnahme von Ferrichrom A und Ferrirubin nicht zu verzeichnen ist. Bei Kompetitionsmessungen konnte allerdings ein außerordentlich starker Inhibitionseffekt sowohl der Ferricrocin- als auch der Coprogenaufnahme durch Ferrirubin und in geringerem Maße auch durch Ferrichrom A nachgewiesen werden (88). Die Zugabe von 0,1 /uM Ferrirubin reicht beispielsweise aus, die Coprogenaufnahme (10 /uM angeboten) um 60% zu hemmen. Ferrirubinzugabe in Höhe der Substratkonzentration (10 /uM) bewirkt eine Inhibition der Coprogenaufnahme zu etwa 95%. Selbst bei einem Substratüberschuß von 200 /uM kann die Inhibition durch Ferrirubin nicht beseitigt werden.

Die Schlußfolgerung, die aus diesen kinetischen Daten gezogen werden kann ist die, daß Ferrichrom A und Ferrirubin um den selben Rezeptor wie Coprogen konkurrieren. Sie werden an diesen Rezeptor so fest gebunden, daß weder eine Verdrängung durch andere Substrate, noch eine Dekomplexierung für den Transport, bzw. nach dem Transport durch die Cytoplasmamembran erfolgen kann. Damit ist der Rezeptor für andere Substrate praktisch vollständig blockiert.

Da nun die definierte chemische Struktur der aktiven Lagen in biologischen Makromolekülen - und bei dem hier untersuchten Siderophorrezeptor dürfte es sich um ein Protein handeln (15, 16, 18, 27-30) - eindeutig bestimmt, welche funktionellen Gruppen des Chelats mit den aktiven Zentren des Rezeptors in Wechselwirkung treten, können nur gemeinsame Eigenschaften für die gemeinsame Erkennung verantwortlich sein.

Gemeinsame Eigenschaften zwischen Ferrirubin und Coprogen sind einerseits in den Isopentenolresten an den Hydroxamatgruppen und andererseits in den vergleichbar großen Molekülparametern zu finden. Die endständige Alkoholgruppe spielt bei der Erkennung offensichtlich eine besonders wich-

tige Rolle, da der Hemmeffekt mit Ferrirubin viel ausgeprägter ist als mit Ferrichrom A. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für die Rezeptor - Substrat - Wechselwirkung der Reihe Ferrichrysin - Ferrichrom A - Ferrirubin - Coprogen neben den elektronischen Faktoren des Eisenzentrums, die auch im vorangegangenen Abschnitt als relevant erkannt wurden, der Strukturparameter der Hydroxamatreste eine zentrale Rolle spielt.

Betrachtet man die Reihe Ferrichrysin - Ferricrocin - Ferrichrom A - Ferrirubin, sollte man mit der zunehmenden Isomerieverschiebung auch wachsende Aufnahmeraten erwarten. Die Ferrichrysinabkömmlinge werden jedoch überhaupt nicht aufgenommen. Da jedoch die Ferricrocinaufnahme (10 /uM) schon bei Zugabe von Ferrirubin in einer Konzentration von 0,1 /uM zu 90% gehemmt wird, muß auch hier von einer äußerst effektiven Bindung durch den Rezeptor ausgegangen werden (88).

Gemeinsame Merkmale dieser Siderophore sind das Peptidgerüst, die Verzerrung des Fe - O - Oktaeders und die vermutlich vergleichbar hohen Werte der Isomerieverschiebung. Unterschiede zu Ferricrocin bestehen in der zusätzlichen Seringruppe und dem langen Isopentenolrest. Da Ferrichrysin - wenn auch mit deutlich niedrigeren Raten - aktiv aufgenommen wird (s. Abb 44),können als entscheidende Faktoren für die Blockierung der Dekomplexierung nur die Isopentenreste in Frage kommen.

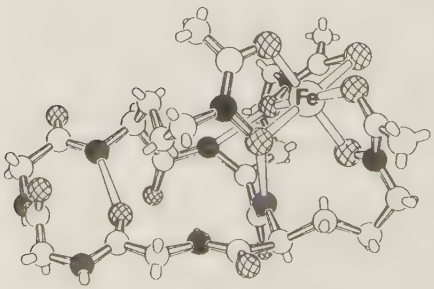


Abb. 61: Nicholson-Modell von Ferrichrom, nach (201).

V.1.3. Ein oder zwei Aufnahmesysteme?

Wie schon in II. gezeigt, bestehen zwischen Coprogen und den Siderophoren der Ferrichromreihe deutliche strukturelle Differenzen. Die ferrichromartigen Siderophore besitzen als Gerüst ein cyclisches Hexapeptid mit Faltblattstruktur. Über dem Ring komplexieren die Ornithinreste mit ihren Hydroxamatgruppen kugelförmig das Eisen, und zwar in einer Λ - cis Anordnung (II.1. und IV.1.1.). Diese Anordnung wird vermutlich durch die lineare "Hintereinanderschaltung" der L-Ornithingruppen durch Peptidbindung erzwungen.

Bei Coprogen hingegen sind 2 L-Ornithingruppen über eine Dipeptidbindung cyclisch als Diketopiperazin miteinander verknüpft. Im Komplex ergeben diese 2 Ornithingruppen eine wenig flexible "Säule" mit dem Diketopiperazinring als Basis. Ein zweiter, kleinerer Ornithin-Isopentenol-Esterring steht seitlich weg und ist über den Isopententeil mit einem Hydroxamatkohlenstoff des ersten Rings verbunden. Das Eisen ist in einer Mulde zwischen diesen beiden voluminösen Gerüstteilen komplexiert. Da die Ornithingruppen nicht hintereinander via Peptidbindung gekoppelt sind, sollte man für die Anordnung am Fe - Zentrum ein Racemat erwarten. Die CD-Spektren ergeben jedoch eindeutig eine Δ - Symmetrie (IV.1.1.). Dies mag mit dem Ornithin-Esterring zusammenhängen, da bei Enterobactin, dessen esterverknüpfter L-Serinring ebenfalls eine Δ-Anordnung am Fe - O - Oktaeder bewirkt.

Sollten die Siderophore Ferrichrysin, Ferricrocin, Ferrichrom A, Ferrirubin und Coprogen über einen gemeinsamen Rezeptor aufgenommen werden, so ergibt sich aus der Diskussion der vorhergehenden Kapitel, daß für die Erkennung bzw. den Transport allein die elektronische Struktur des Eisenzentrums und evtl. dessen Symmetrie als gemeinsames Merkmal in Frage kommen kann. Die Beschränkung auf die elektronischen Parameter allein ist jedoch wenig wahrscheinlich, wenn man die folgenden 3 Aspekte mit berücksichtigt.

1. Aus Kompetitionsuntersuchungen zwischen Enterobactin (Δ-cis) und aus D-Serin synthetisiertem Enantioenterobactin (Λ -cis), sowie zwischen Enantioenterobactin und Colicin B bei E.coli konnte der Schluß gezogen werden, daß nicht nur der Transport, sondern auch die Bindung des synthetischen Enantiomeren gegenüber dem natürlichen Enterobactin stark erniedrigt ist (88). P.parvum, dem sowohl Ferrichrom als auch synthetisches Enantioferrichrom (Δ-cis) angeboten wurde, zeigte nur mit dem natürlich vorkommenden Ferrichrom eine konzentrationsabhängige Sättigungskinetik. Entsprechende Untersuchungen an N.crassa (83) ergaben das selbe, allerdings handelt es sich hier nicht um eine Aufnahme, sondern lediglich um stereospezifische Adsorption. In einem der Teilprozesse der Erkennung bzw. des Transports muß also neben den schon genannten Faktoren zusätzlich eine Unterscheidung der optischen Isomeren erfolgen. Solch selektive Rezeptoreigenschaften machen es unwahrscheinlich, daß die Ferrichrome und Coprogen über ein System erkannt werden.
2. Wie aus den vorangegangenen Diskussionsabschnitten ersichtlich ist, zeigt der Vergleich der 2 Reihen: Coprogen - Ferrichrom A - Ferrirubin,sowie Ferrichrysin - Ferricrocin - Ferrichrom A - Ferrirubin eine unterschiedliche Argumentation für die Erklärung der beobachteten Phänomene. In der Ferrichromreihe muß die feste Bindung an den Rezeptor über das Molekülgerüst und Eisenzentrum erfolgen. Die Dekomplexierung wird jedoch durch die voluminösen Isopentenreste gehemmt und dadurch die Aufnahme blockiert. Bei Coprogen hingegen sind die gemeinsamen Merkmale für die Erkennung zusammen mit Ferrichrom A und Ferrirubin gerade die voluminösen Reste und wiederum die elektronischen Verhältnisse am Eisen. Eine Dekomplexierung der Inhibitoren dürfte hier wegen des unterschiedlichen Molekülgerüsts ausbleiben. Auch dieser Vergleich deutet darauf hin, daß 2 Aufnahmesysteme vorhanden sind.
3. Wie im folgenden Kapitel genauer ausgeführt, scheint Ferricrocin im Stoffwechsel von N.crassa eine andere Funktion zu erfüllen, als Coprogen. Dies läßt ebnefalls 2 Aufnahmesysteme vermuten

V.2. ÜBER DIE MECHANISMEN DER SIDEROPHOR-EISEN-AUFNAHME BEI N.CRASSA .

V.2.1. Modelle des aktiven Transports.

Mikroorganismen können meistens mehrere Siderophore aufnehmen, oft auch speziesfremde, die von ihnen selbst nicht produziert werden können. Sie besitzen dafür spezielle Aufnahmesysteme, deren charakteristische Eigenschaften ausschliessen, daß Siderophore die Membran aufgrund von Diffusion passieren (94-96, 194-196).

Die meisten, bis jetzt vorgeschlagenen Modelle für aktiven Transport gehen von einem substratspezifischen Carrier-Protein aus, das sich von der hochaffinen in die weniger affine Form verwandelt und umgekehrt. Dieser Prozeß ist energieverbrauchend und ermöglicht die Anlagerung des Substrats an der Außenseite der Membran und dessen Ablösung an der Innenseite und die Rückkehr in die hochaffine Form nach außen. Dieser zyklische Prozeß ermöglicht einen unidirektionalen Transport gegen einen Gradienten, also eine Anreicherung im Inneren der Zelle.

Beim aktiven Transport entsteht ein Konzentrationsgradient des transportierten Substrats, ohne daß es sich dabei chemisch verändert. Es gibt jedoch auch einen anderen energieverbrauchenden Transport, bei dem das transportierte Substrat obligatorisch in eine andere chemische Form gebracht wird. Dies ist bei vielen Bakterien der Fall, wo z.B. Glucose während des Transports phosphoryliert wird. Dieser Vorgang braucht Energie, kann aber im engeren Sinne nicht aktiver Transport genannt werden, denn durch die chemische Veränderung des Substrats wird nicht entgegen einem Konzentrationsgefälle transportiert, obwohl eine Anreicherung in der Zelle erfolgt.

Wichtige Kriterien für den katalysierten Transport sind in beiden Fällen Sättigungskinetiken analog der Michaelis-Menten Kinetik, Spezifität und z.T. Stereospezifität. Ein drittes Kriterium für den katalysierten oder "carrier-mediated" Transport ist die spezifische Hemmbarkeit durch struk-

turell ähnliche Substanzen, die um spezifische Bindungsstellen konkurrieren, oder das Blockieren funktionell wichtiger Gruppen an dem Bindeprotein durch SH-alkylierende oder Aminogruppen blockierende Substanzen. All diese Eigenschaften treffen für das Coprogenaufnahmesystem zu (15,28,29,83,88, 197,198).

Außer dem Carrier-Modell gibt es auch noch das Porenmodell. Poren sind in ihren kinetischen Eigenschaften, der Fähigkeit zur spezifischen Bindung und in der Energieabhängigkeit nicht unbedingt vom Carrier zu unterscheiden. Es sollte aber gerade auch bei größeren Molekülen dieses Porenmodell in Betracht gezogen werden.

In dem nun folgenden Teil sollen die möglichen Reaktionsschritte beim Membrantransport etwas differenziert werden, wobei der energetische Aspekt lediglich konstatiert wird, da er nicht Gegenstand der vorliegenden Untersuchung ist.

Folgende Reaktionsschritte erscheinen möglich und sinnvoll (Fe = Fe^{3+} ; Li = Komplexbildner ; red = reduzierte Form ; ox = oxidierte Form):

1. Fe + Li $\longrightarrow$ Fe-Li

Der Chelator wird in das Medium ausgeschieden und löst dort ausgefälltes Eisenoxidhydrat durch Komplexierung des gemäß Löslichkeitprodukt freien Fe^{3+}.

2a. FeLi + Rezeptor FeLi-Rezeptor

Der Eisenkomplex wird spezifisch an einen Rezeptor gebunden(Zur Frage spezifischer, nicht kovalenter Bindung, s. Kapitel V.1.)

2b. FeLi + Rezeptor $\rightleftharpoons$ Fe-Rezeptor + Li

Dieser Vorgang entspricht einem "Taxi"-Modell des Transports (21).Da dieser Prozeß bei den in dieser Arbeit untersuchten Aufnahmen ausgeschlossen werden kann, werden die möglichen Folgereaktionen nicht weiter berücksichtigt.

3a. FeLi---Rezeptor(out) $\overset{\text{Energie}}{\rightleftharpoons}$ FeLi--Rezeptor(in)

Ein direkter Prozeß. Der Rezeptor hat die zwei Funktionen Erkennung und Transport

3b. Ein indirekter Prozeß. Für den Transport durch die Membran ist ein spezielles Transport-Protein notwendig. Sieht man von der Möglichkeit der Eisenabgabe vom Komplex-Rezeptorsystem an dieses Protein ab, ist eine Übernahme des Gesamtkomplexes anzunehmen. Es gilt dann:

$$\text{FeLi--Rezeptor} + \text{Transport-protein} \xrightarrow{\text{Energie}} \text{FeLi--Tranportprotein} + \text{freier Rezeptor}$$

gefolgt von:

$$\text{FeLi--Transportprotein(out)} \xrightarrow{\text{Energie}} \text{FeLi--Transportprotein (in)}$$

Weitere mögliche Differenzierungen sollen hier unberücksichtigt bleiben, da sie spekulativ bleiben, solange nicht die funktionelle Trennung zwischen Erkennung und Transport im jeweiligen System erwiesen ist.

3c. Die Translokation könnte auch über eine enzymatische Reduktion (evtl. auch Selbstreduktion-s.Enterobactin) in der Membran mit oder ohne Beteiligung eines Transportproteins erfolgen

$$\text{FeLi--Träger} + \text{Enzym(red)} \longrightarrow Fe^{2+} + \text{Li} + \text{Träger} + \text{Enzym(ox)}$$

Der restliche Weg kann durch Diffusion oder über einen Fe^{2+}--Komplexbildner von statten gehen.

3d. Es findet eine (intermediäre) Anreicherung des Komplexes in einer Tasche oder Blase der Membran statt

$$\text{FeLi--Rezeptor} \xrightarrow{\text{Energie}} \text{FeLi(pool)} + \text{Rezeptor}$$

Diesem Anreicherungsschritt folgte eine Diffusion in das Cytoplasma durch Porenöffnung o.ä.

$$\text{FeLi (pool)} \xrightarrow{\text{Energie}} \text{FeLi (Cytoplasma)}$$

Dieser Modellvorschlag ist der einzige, bei dem der Gesamtablauf des Transports nicht kontinuierlich, sondern diskontinuierlich abläuft.

4. Im Falle 3a und 3b stellt sich das Problem, wie die Loslösung vom Protein erfolgt.

4a. $FeLi\text{--}Protein(in) \xrightarrow{pH,\ etc.} FeLi + Protein(in/out)$

Aufgrund der im Cytoplasma vorhandenen Bedingungen ist die Ablösung des Komplexes vom Protein thermodynamisch und/oder kinetisch ohne weitere Zwischenschritte möglich (pH, Ionenstärke, Potential).

4b. $FeLi\text{--}Protein(in) + L_j \longrightarrow FeL_j + L_i + Protein(in/out)$

$FeL_j + L_i \quad Protein(in/out)$

Es erfolgt eine Umkomplexierung mit einem stärkeren Komplexbildner.

4c. $FeLi\text{--}Protein(in) + Enzym(red) \rightarrow Fe^{2+} + Enzym(ox) + L_i + Protein$

bzw. $L_i \quad Protein$

Das Eisen wird an der Membraninnenseite enzymatisch reduziert. Diese Reduktion ist notwendiger Bestandteil des aktiven Transportzyklus.

4d. Statt eines reduzierenden Enzyms ist auch ein den Komplex spaltendes Enzym möglich.

V.2.2. Die Doppelfunktion des Coprogens: Eisenaufnahme und Eisenspeicherung.

Folgende Fakten können als gesichert angesehen werden:

a) Nach 1o Minuten Aufnahme liegen 2 Coprogen-Spezies vor: eine konzentrierte und eine hochverdünnte.

b) Nach 3o Minuten Aufnahme ist spektroskopisch nur die hochverdünnte Spezies nachweisbar.

c) Nach ebenfalls 3o Minuten treten Fe^{2+}-high-spin- Absorptionen auf.

d) Das 2-Stunden-Spektrum entspricht der Hochkonzentrationsform.

Läßt man zunächst die Tatsache zweier Spezies im 1o-Minuten-Spektrum beiseite, so kann der Schluß gezogen werden, daß Coprogen sich in einer Umgebung befinden muß, in der es sich statistisch verteilen kann. Wegen der ständigen Akkumulation von Coprogen durch die Zelle (s.Abb.43), nimmt im Laufe der Zeit die Konzentration zu. Damit erklärt sich die Veränderung des Spektralbildes von der hochverdünnten Form nach 3o Minuten in die konzentrierte Form nach 2 Stunden.

Als Medium der statistischen Verteilung kommt das Cytoplasma oder ein Kompartiment der Zelle in Frage. G. Müller (1o6) konnte durch Zellfraktionierung nachweisen, daß der größte Teil des angebotenen ^{55}Fe-Coprogens in der Cytoplasmafraktion lokalisiert ist. Im Cytoplasma von N.crassa wurde andererseits eine NADH-abhängige Oxido-Reduktase nachgewiesen, die die Reduktion von Coprogen katalysiert (93). Deswegen wurde vermutet, daß die Reduktion des Eisen-Coprogen-Komplexes die treibende Kraft des aktiven Transports sei. Auf der Basis der vorliegenden Ergebnisse kann diese Hypothese als widerlegt betrachtet werden. Spektroskopisch nachweisbar ist Fe^{2+} erst nach 3o Minuten Aufnahme, nach 2 Stunden sind 9% und nach 4 Stunden 3o% des angebotenen Coprogens reduziert.

Man könnte nun natürlich noch vermuten, daß - zumindest intermediär - chemische Reaktionen des Coprogens stattfinden. So isolierte Emery lösliche Ornithinesterasen bei Fusarium und Penicillium specialis, die Fusigen und Triacetylfusigen

spalten (9o). Die mit einer solchen Spaltung verbundene drastische Änderung der Molekülstruktur müßte sich jedoch auch möbbauerspektroskopisch nachweisen lassen. Dies ist nicht der Fall. Es spricht auch alles gegen die Vermutung einer peripheren Kopplung (Phosphorylierung o.ä.). Wegen der großen Empfindlichkeit der möbbauerspektroskopischen Parameter der Siderophore auch bzgl. kleiner Strukturveränderungen der Peripherie, ist ein solcher Zwischenschritt ebenfalls äußerst unwahrscheinlich. Formen physikalischer Bindung sind davon allerdings nicht tangiert. Solche Formen reversibler, nicht kovalenter Bindung sind ja gerade die Basis molekularer Erkennung durch den Rezeptor (s.V.1.).

Unter Würdigung der genannten Aspekte kann man es als erwiesen ansehen, daß Coprogen chemisch unverändert durch die Membran geschleust und in das Cytoplasma abgegeben wird. Von den in V.2.1. angegebenen Möglichkeiten des aktiven Transports lassen sich somit all diejenigen ausklammern, die eine Veränderung des Komplexes als transportnotwendig implizieren. Das "Taxi"-Modell 2b oder eine Umkomplexierung an der Membraninnenseite(4b) sind genauso wenig zur Beschreibung des aktiven Transports durch die Cytoplasmamembran geeignet wie die enzymatischen Reduktionen 3c und 4c.

Wenngleich der Prozeß der Dekomplexierung und Reduktion des Eisens nicht transportbestimmend ist, so wird natürlich bei Bedarf sukzesssiv Eisen dem Zellmetabolismus zugeführt. In den Spektren sind keine weiteren Fe(III)-Spezies nachweisbar, weswegen die Umkomplexierung auf andere Fe(III)-Komplexbildner als echte Zwischenstufe ausgeschlossen werden kann. Die Dekomplexierung des Eisens ist somit direkt an die Reduktion gekoppelt.

Interessant ist die Tatsache, daß die Fe(II)-Absorptionen nach 3o Minuten Aufnahme bei δ = + 2,74 mm/s liegt, während nach 2 stündiger Inkubation ein deutlich niedrigerer Wert δ = + 2,35 (2,o5) mm/s zu beobachten ist. Diese Umkomplexierung im Fe(II)-Bereich könnte auf eine Fe(II)-Zwischenstufe hindeuten, die das Eisen für weitere Stoffwechselprozesse verfügbar macht. So konnte bei Streptomyceten der Fe(II)-

Komplexbildner Deferroviridomycin A isoliert werden (99), der dem Trihydroxamat-Siderophor Ferrioxamin B das Eisen unter Reduktion entziehen kann. Eine eindeutige Klärung dieser Frage bedarf ebenso einer detaillierteren zukünftigen Analyse, wie die Zuordnung der neu entstandenen Absorptionen zu den korrespondierenden Zellfunktionen.

Wenden wir uns nun dem Problem zweier Coprogen-Spezies im 1o-Minuten-Spektrum zu. Coprogen wird, wie schon gezeigt, im Cytoplasma gespeichert. Die Verhältnisse dort sind - zumindest bei einer Konzentration, die einer 1o-minütigen Aufnahme entspricht - durch große diamagnetische Verdünnung geprägt. Die hochkonzentrierte Spezies muß deshalb auf dem Weg in das Cytoplasma, also irgendwo in oder an der Cytoplasmamembran intermediär akkumuliert werden.

Diese Konzentrierung in der Membran ist allerdings nur denkbar, wenn die Aufnahme kein kontinuierlicher, sondern ein diskontinuierlicher Prozeß ist. Ein Indiz dafür, daß es sich bei der Coprogenaufnahme um einen ständigen, aber diskontinuierlichen Prozeß handelt,bietet schon die Aufnahmecharakteristik (s.Abb.43). Zwischen unterschiedlichen Akkumulationszyklen sind Plateau-Phasen eingeschoben. Ferner konnte anhand von Untersuchungen zur Energetisierung des Siderophor-Eisen-Transports bei N.crassa (1o6) die Diskontinuität ebenfalls festgestellt werden.

Es ließ sich zeigen, daß während der Aufnahmephase der intrazelluläre ATP-Spiegel unverändert bleibt, während er in der Plateau-Phase absinkt. Es wird offensichtlich während der Coprogenaufnahme selbst kein ATP verbraucht, sondern erst in der Plateau-Phase. Die Vermutung, es könne sich um eine energieunabhängige Adsorption handelt, der ein ATP-verbrauchender Translokationsschritt während der Plateauphase folgt, konnte widerlegt werden. Um eine Folgereaktion des Stoffwechsels auf die Eisenzufuhr kann es sich kaum handeln,denn wie die Messungen dieser Arbeit zeigen, ist selbst nach 2o-minütiger Coprogenaufnahme keine Dekomplexierung und Reduktion feststellbar.

Man kann also schließen, daß das Coprogenaufnahmesystem in einem vorenergetisierten Zustand vorliegt bzw. ein Energiedonator bereit steht, der erst nach einer gewissen Aufnahmezeit verbraucht ist, und dann über ATP neu regeneriert werden muß.

Die energetischen Verhältnisse wurden an dieser Stelle deshalb ausführlicher referiert, weil sie hervorragend mit den Schlußfolgerungen über die Existenz der Hochkonzentrationsform korrelieren. Dies läßt sich folgendermaßen formulieren: Coprogen wird von einem vorenergetisierten Rezeptor erkannt, und aktiv in einem pool in oder an der Cytoplasmamembran angereichert. Dieser Schritt ist nicht direkt ATP-abhängig. In der Plateauphase entleert sich der pool in das Cytoplasma und die Rezeptorsysteme werden durch Energetisierung wieder regeneriert. Zu Beginn des 2. Akkumulationszyklus ist deshalb Coprogen nur noch in hochverdünnter Form vorhanden.

Natürlich kann man fragen, warum die hochkonzentrierte Spezies nach 3o Minuten nicht beobachtet wird. Bei Richtigkeit des vorgeschlagenen Modells, beginnt nach etwa 3o Minuten eine 2. Plateauphase, sodaß eine pool-Entleerung schon stattgefunden haben kann. Außerdem ist zu diesem Zeitpunkt die Menge an hochverdünntem Coprogen im Cytoplasma schon relativ groß. Die relative Intensität der konzentrierten Form ist daher gering und könnte durch das komplexe Aufspaltungsmuster der verdünnten Spezies "geschluckt" werden.

V.2.3. Ferricrocin - ein Eisenspeicher besonderer Art.

Ein Vergleich der Coprogen-und Ferricrocinaufnahme anhand der Mößbauerspektroskopie führt zu dem überraschenden Befund. unterschiedlicher Verwertung durch die Zelle. Ferricrocin steht dem Eisenmetabolismus kurzfristig überhaupt nicht und längerfristig nur in einem geringen Ausmaße zur Verfügung.

Der Zellmetabolismus ist offensichtlich nicht für eine Dekomplexierung des Ferricrocins in ausgekeimtem Mycel (24 bis 48 Stunden alt) gerüstet. Wäre nämlich eine enzymatische Dekomplexierung des Ferricrocins für den Zellstoffwechsel möglich, müßten nach einstündiger Inkubation längst Fe(II)-Absorptionen im Mößbauerspektrum auftreten, da enzymatische Syteme im Bedarfsfall schwerlich länger als 3o Minuten für ihre Induktion benötigen. Dieser Bedarfsfall liegt mit Sicherheit vor, wenn man bedenkt, daß die Zellen im Eisenmangel angezogen wurden und Eisen für ihre Stoffwechselprozesse dringend benötigen.

Für die Tatsache, daß nach 4 Stunden Inkubation sich dennoch ein sehr kleiner Teil an Fe(II) gebildet hat gibt es zwei mögliche Erklärungen. Entweder kann wegen der prinzipiellen kinetischen Labilität von Fe(III)-high-spin-Komplexen ein geringer Teil des Eisens durch andere Komplexbildner dem Gleichgewicht entzogen werden - zu denken wäre da z.B. an Desferricoprogen, das mit seiner etwas größeren Komplexbildungskonstante(s.Tabelle 4) in einer Eisenmangelsituation sicherlich im Cytoplasma vorliegt-; oder aber es existiert ein enzymatisches System der reduktiven Dekomplexierung, das aber gegenüber Ferricrocin eine extrem niedrige Spezifität aufweist. Insgesamt kann gesagt werden, daß die Funktion der Ferricrocin-Aufnahme sicher nicht in direkter Weise mit dem Eisenmetabolismus korreliert.

Für die besondere Rolle von Ferricrocin im Stoffwechsel von Ferricrocin wurden auch an anderer Stelle Beweise gefunden. So konnte bei Untersuchungen der Konidien von N.crassa festgestellt werden, daß in Lösungen niedriger Wasseraktivität Ferricrocin, das einen zur Auskeimung notwendigen Faktor

darstellt, aus den Sporen herausgelöst wird (199). In jener Arbeit ließ sich Ferricrocin im Mycel und insbesondere in den Konidien nachweisen, nicht jedoch im Kulturfiltrat.

Auch bei anderen Ascomyceten, wie Aspergillus nidulans und Penicillium chrysogenum konnten spezifische intrazelluläre Siderophore isoliert werden, die sich von denen unterscheiden, die ins Medium ausgeschieden werden (200).

Die Rolle von Ferricrocin als lediglich intrazellulärer Speicher, wie es in (199) behauptet wird, steht allerdings in eklatantem Widerspruch zu den Erfahrungen in unserem Labor und den, in dieser Arbeit bei der Isolation von Coprogen gewonnenen Erkenntnissen. In der logarithmischen Wachstumsphase war dünnschichtchromatographisch in der Tat kein Ferricrocin im Kulturfiltrat nachweisbar. Zu Beginn der stationären Wachstumsphase (nach ca. 3 Tagen) konnte Ferricrocin in kleinen Mengen aus dem Medium säulenchromatographisch isoliert werden.

Wie die Messungen dieser Arbeit zeigen, fungiert Ferricrocin während der logarithmischen Wachstumsphase als quasi inerter Eisen-Speicher und ist nicht am Eisenmetabolismus beteiligt. Da nun Ferricrocin sicher nicht Auswuchs einer Stoffwechselentgleisung ist, muß seine Bedeutung in Übereinstimmung mit (199) im Zusammenhang mit der Sporulation stehen. Diese Schlußfolgerung korreliert einerseits mit der erhöhten Produktion von Ferricrocin mit zunehmender Zellalterung, und andererseits mit der Tatsache, daß Ferricrocin notwendiger Faktor bei der Sporenkeimung ist(199).

Interessant sind in diesem Zusammenhang auch die Überlegungen von Abschnitt V.1. Eine vergleichende Untersuchung von Molekülparametern und Aufnahmecharakteristika führte dort zur Hypothese zweier Aufnahmesysteme der Siderophore Ferricrocin und Coprogen bei N.crassa. Im Lichte der hier herausgearbeiteten unterschiedlichen Funktionen der beiden Siderophore erhält diese Hypothese ein hohes Maß an Validität.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Die ermittelten Mößbauer-Parameter von Ferricrocin und Coprogen sind typisch für Fe(III) high-spin. Der Rhombizitätsparameter λ und der Kristallfeldaufspaltungsterm D stimmen mit schon durchgeführten ESR-Messungen in hervorragender Weise überein. Alle untersuchten Siderophore zeigten sehr starke Spin-Spin-Relaxation, die mit Hilfe eines Verdünnungsverfahrens mit Rinderserumalbumin beseitigt werden konnte.

2. Periphere Reste der untersuchten Siderophore der Ferrichrom-Reihe beeinflussen die Mößbauerparameter δ, λ, A, E_Q sehr deutlich. Die Änderung der Werte konnte mit der Siderophor-Eisenaufnahme bzw. -adsorption korreliert werden. Allerdings sind nicht allein die Eigenschaften des Eisen-Zentrums, sondern auch weitere Strukturparameter (die Trennung beider Anteile war teilweise nicht möglich) für die molekulare Erkennung durch den Rezeptor der Cytoplasmamembran verantwortlich.

3. Für künftige Simulationen der Spektren wird ein modifizierter Spin-Hamiltonoperator vorgeschlagen, der die Unterscheidung zwischen cis/trans-Isomerie und Verzerrung des Achsensystems erleichtern soll.

4. Aufgrund theoretischer Überlegungen wird die Existenz von trans-Isomeren des Coprogens vorausgesagt und eine erweiterte Nomenklatur für untereinander verknüpfte Trichelat-Komplexe des Typs MA_3B_3 vorgeschlagen.

5. Neuspora crassa nimmt Coprogen als intaktes Molekül auf und reichert es im Cytoplasma an. Dort dient es als Eisenspeicher, wobei das Eisen nach Bedarf entzogen wird. Eine Speicherfunktion der Siderophore wurde bislang noch nicht in Erwägung gezogen.

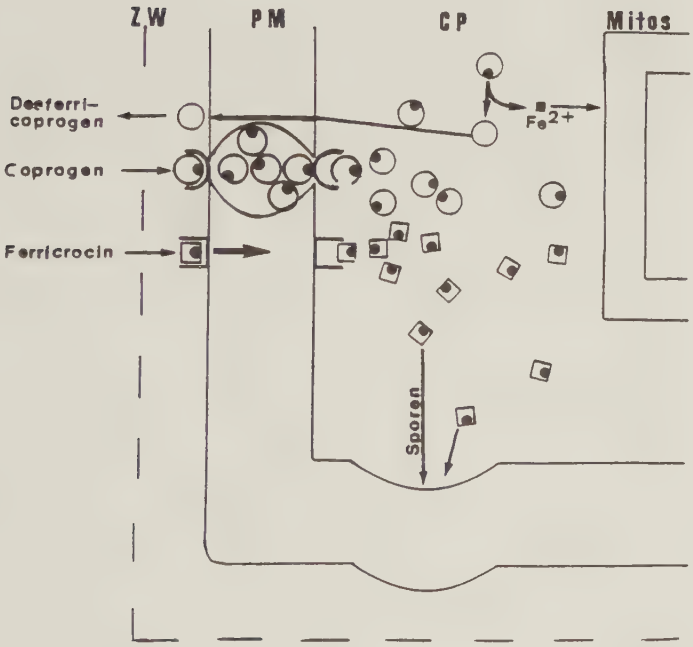
6. Eine Umkomplexierung auf andere Fe(III)-Spezies als mögliche Transmitter findet nicht statt. Vielmehr wird das Eisen aus Coprogen reduktiv dekomplexiert. Die Möglichkeit einer einer Fe(II)-Zwischenstufe muß in Zukunft einer genaueren Betrachtung unterzogen werden.

7. Ferricrocin wird ebenfalls im Cytoplasma angereichert, ist aber für den aktuellen Eisenmetabolismus der Zelle praktisch nicht verfügbar. Während des Zellwachstums stellt Ferricrocin mithin einen quasi inerten Eisen-Speicher dar, dürfte aber eine wichtige Funktion bei der Sporulation besitzen. Die zentrale Rolle des Ferricrocins bei der Sporenkeimung wurde schon an anderer Stelle nachgewiesen.

8. Der Aufnahmeprozeß von Coprogen und Ferricrocin unterscheidet sich ebenfalls. Die Coprogenaufnahme erfolgt über einen Zwischenschritt - also diskontinuierlich -, bei dem es intermediär konzentriert wird. Für diesen Zwischenschritt wird ein Poren- oder Taschenmodell vorgeschlagen.

Die Ferricrocinaufnahme erfolgt nicht über eine derartige Zwischenstufe. Unter Berücksichtigung weiterer struktureller (e.g. Coprogen: Δ , Ferricrocin: λ) und aufnahmespezifischer Unterschiede wird die Existenz zweier Aufnahmesysteme vermutet.

9. Für die Siderophoraufnahme bei Neurospora crassa wird deshalb das folgende Modell vorgeschlagen:



VII. LITERATURVERZEICHNIS

1. Lankford, L.E.; Crit.Rev.Microbiol. 3, 273 (1973)
2. Weinberg, E.D., Brooks, J.I.; Nature 199, 1963 (19)
3. Light, P.A., Clegg, R.A. in: Microbial Iron Metabolis lism (J.B. Neilands, Ed.), Academic Press, N.Y., 1974, S.35-64
4. Carnahan, J.E., Castle, J.E.; J.Bacteriol. 75,121 (1958)
5. Eady, R.R., Postgate, J.R., Nature 249, 8o5 (1974)
6. Winder, F.G., O'Hara, C., Biochem.J. 82, 98 (1962)
7. Byers, B.R., Arcenaux, J.E.L. in: Microorganisms and Minerals (E.D.Weinberg, Ed), Marcel Deccer Inc. N.Y., Basel, S. 215 - 25o.
8. Wettstein, F.O., Stent, G.S., J.Mol.Biol. 38, 25 (1968)
9. Rosenberg, A.H., Gefter, M.L., J.Mol.Biol. 46, 581 (1969)
1o. Handbook of Chemistry and Physics, 51 st Edition (1971), CRC
11. Biederman, G., Schindler, P., Acta Chem. Scand., 11, 731 (1957)
12. Spiro, T. G., Bates, G., Saltman, P., JACS 89, 5559 (1967)
13. Hancock, R.E.W., Handtke, K., Braun, V., J.Bact. 127, 137o (1976)
14. Frost, G.E., Rosenberg, H., Biochim. Biophys. Acta 33o, 9o (1973)
15. Winkelmann, G., Zähner, H., Arch. Microbiol. 88, 49 (1973)
16. Arcenaux, J.E.L., Davis, W.B., Downer, D.N., Haydon, A.H., Byers, B.R., J. Bacteriol. 115, 919 (1973)
17. Ashwell, J.E., Haydon, A.H., Turner, H.R., Dawkins, C.A., Arcenaux, J.E.L., Byers, B.R., J. Bacteriol. 13o, 173 (1977)
18. Leong, J., Neilands, J.B., J.Bacteriol. 126, 823 (1976)

19. Luckey, M., Pollak, Y.R., Wayne, R., Ames, B.N., Neilands, J.B., J.Baceriol. 111, 731 (1972)
2o. Neilands, J.B. (Ed.), Iron Metabolism, Academic Press N.Y. (1974)
21. Stephenson, M.C., Ratledge, C., J.Gen. Microbiol. 11o, 193 (1979)
22. Neilands, J.B. in: Inorganic Biochemistry I (G.L. Eichhorn, Ed.), Elsevier, N.Y. (1973), S.167-2o2.
23. Emery,T., Emery,L., Biochem.Biophys.Res.Commun. 5o, 67o (1973)
24. Weinberg, E.D., Science 184, 952 (1974)
25. Glynn, A.A., Symp.Soc.Gen.Microbiol. 22, 75 (1972)
26. Andersen, W.F., Hiller, M.C., DHEW Publication (NIA) 77 (1975)
27. Emery, T., Biochemistry, 1o, 1483 (1971)
28. Ernst, J., Winkelmann, G., Arch. Microbiol., 1oo, 271 (1974)
29. Ernst, J., Winkelmann, G., FEBS Letters 76, 71 (1977)
3o. Wiebe, C., Winkelmann, G., J.Bacteriol. 123, 837 (1975)
31. Weißbluth, M., Structure and Bonding 2, 1 (1967)
32. Lang, G., Aasa, R., Garbett, K., Williams, R.J.P., J.Chem. Phys. 55, 4539 (1971)
33. Schulz, C., Debrunner, P.G., J.Phys.(Paris), Colloque 6, Supplement au no.12, Tome 37, S.153 (1976)
34. Griffith, J.S., Mol. Phys. 8, 213 (1964)
35. Griffith, J.S. Mol. Phys. 8, 217 (1964)
36. Blumberg, W.E. in: Magnetic Resonance in Biological Systems (B.E.Malmström, T.Vänngard, Eds.), Pergamon Press, London (1967), S.119-133.
37. Poole, C.P., Farach, H.A., Jackson, W.K., J. Chem. Phys. 61, 222o (1974)
38. Abragam, A., Horowitz, P., Proc. Roy. Soc. A 23o, 169, (1955)
39. Freeman, A.J., Watson, R.E., Phys.Rev. 131, 2566 (1963)
4o. Davis, R.H., Lawless, M.B., Port, L.A., J. Bacteriol. 1o2, 299 (197o)

41. Ilgner, D.: Untersuchungen zur Sideraminabhängigkeit bei einer Ornithin-Mangelmutante von N.crassa, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1971).
42. Neilands, J., Structure and Bonding 1, Springer Verlag Berlin,Heidelberg, N.Y. (1966), S 59-1o8.
43. Hartmann, E.: Vorkommen und Verteilung von Sideraminen in Neurospora crassa, sowie Versuche zur Eisenaufnahme. Dissertation, Universität Tübingen (1973).
44. Keller-Schierlein, W., Diekmann, H.; Helv. Chim. Acta 53, 2o35 (197o)
45. Ivens, W.: Mößbauerspektroskopische Untersuchungen von Sn(II)-Verbindungen, Diplomarbeit, Universität Tübingen (1978)
46. Forster, A.A., Halder, N., Kalvius, G.M.; Meßtechnik 12, 347 (1972)
47. Kalvius, G.M., Kankeleit, E.; International Atomic Energy Agency, Vienna, Proceeding Series 3o4, 9 (1972)
48. Wender, S.A., Hershkowitz, N.; Nucl. Instrum. Meth. 93, 571 (1971)
49. Aramu, F., Maxia, V.; Nucl. Instrum. Meth. 8o, 35 (197o), sowie
Nucl. Instrum. Meth. 83, 1o9 (197o)
5o. Ruby, S.L.; Mößbauer Effect Methodology, Vol.8, 263 Plenum Press, N.Y. (1971)
51. Groves, J.L.; Computer Physics Commun. 3, 339 (1972)
52. Ure, M.L., Flinn, P.A.; Mößbauer Effect Methodology, Vol.7, Plenum Press, N.Y. (197o), S.245.
53. Kaindl, G., Maier, M.R., Schaller, H., Wagner, F.; Nucl. Instrum. Meth. 66, 277 (1968)
54. Shenoy, G.K., Dunlap, B.D.; Phys. Rev. B 13, 1353 f., 37o9 f. (1976)
55. Shechter, H., Ron, M., Niedzwiedz, S., Herber, R.H.; Nucl. Instrum. Meth. 44, 268 (1966)
56. Violet, C.E., Pipcorn, D.H.; J. Appl. Phys. 42, 4339 (1971)
57. NBS Special Publication 26o - 2o, Washington (1971)

58. Kündig, W.; Nucl. Instrum. Meth. 48, 219 (1967)
59. Kündig, W.; Nucl. Instrum. Meth. 75, 336 (1969)
6o. Margulies, S., Debrunner, P., Frauenfelder, H.; Nucl. Instrum. Meth. 21, 217 (1963)
61. Shenoy, G.K., Wagner, F.E., Eds.: Mössbauer Isomer Shifts, North Holland Publishing, Amsterdam (1978), S. 95.
62. Tasaki, A., Otsuka, J., Kotani, M.; Biochim.Biophys. Acta 14o, 284 (1967)
63. Hossain, M.B., Eng-Wilmot, D.L., Lohgry, R.A., van der Helm, D.; JACS 1o2, 5766 (198o)
64. Leong, J., Raymond, K.N.; JACS 96, 1757 (1974)
65. Leong, J., Raymond, K.N.; JACS 96, 6628 (1974)
66. Abu-Dari, K, Raymond, K.N.; JACS 99, 2oo3 (1977)
67. Naegeli, H.-U., Keller-Schierlein, W.; Helv. Chim. Acta 61, 2o88 (1978)
68. Zalkin, A., Forrester, J.D., Templeton, D.H., JACS 88, 181o (1966)
69. van der Helm, D., Baker, J.R., Eng-Wilmot, D.L., Hossain, M.B., Loghry, R.A.; JACS 1o2, 4224 (198o)
7o. Norrestam, R., Stensland, B.; Brändén; J. Mol. Biol. 99, 5o1 (1975)
71. Iizuka, T., Kotani, M.; Biochim. Biophys. Acta 154, 417 (1968)
72. Lindner, J.J., Göttlicher, S.; Acta Cryst. B 25, 832 (1969)
73. Murray, K.S., Neuman, P.J., Gatehouse, B.M., Taylor, D.; Aust. J. Chem. 31, 983 (1972)
74. Llinás, M., Neilands, J.B.; Bioinorg. Chem. 2, 159 (1972)
75. Neilands, J.B., loc.cit. 42
76. Eng-Wilmot, D.L., Barnes, C.L., van der Helm, D.; Am. Crystallogr. Assoc. Winter Meeting 1981(March 22-26) Texas A&M University, Program and Abstracts, Ser.2. Vol.9, Mo1, Abstract No. PB2
77. Isied, S.S., Kuo, G., Raymond, K.N.; JACS 98, 1763 (1976)

78. Raymond, K.N., Isied, S.S., Brown, L.D., Fronczek, F. R., Nibert, J.H.; JACS 98, 1767 (1976)
79. Raymond, K.N., Carrano, C.J.; Accounts Chem.Res. 12, 183 (1979)
80. Haugh, E., Rogers, D.;Biochem. Biophys. Res. Commun. 57, 73 (1974)
81. Carrano, C.J., Raymond, K.N.; JACS 100, 5371 (1978)
82. Hantke,K., Braun, V.; FEBS Letters 49, 301 (1975)
83. Winkelmann, G.; FEBS Letters 97, 43 (1979)
84. Frost, G.E., Rosenberg, H.J.; J. Bacteriol. 124, 704 (1975)
85. Negrin, R.S., Neilands, J.B.; J. Biol. Chem. 253, 2339 (1978)
86. Braun, V.: in: Symposia of the S. G. M. No. XXVIII. Relations Between Structure and Function in the Procaryotic Cell (1978)
87. Winkelmann, G., Braun, V.; FEMS Letters 11, 237 (1981)
88. Winkelmann, G.; Arch. Microbiol. 98, 39 (1974)
89. Neilands, J.B., Erickson, T.J., Rastetter, W.H.; J. Biol. Chem. 256, 3831 (1981)
90. Emery, T.; Biochemistry 15, 2723 (1976)
91. Dickmann, H.; Arch. Microbiol. 73, 65 (1970)
92. Fastrich, D.: Untersuchungen zur Regulation der Sideraminbildung und zum Eiseneinbau aus Sideraminen in Protoporphyrin IX bei N.crassa arg-5, ota aga. Dissertation, Tübingen (1974).
93. Ernst, J., Winkelmann, G.; Biochim. Biophys. Acta 500, 27 (1977)
94. Cox, C.D.; J.Bacteriol. 141, 199 (1980)
95. Arcenaux, J.E.L., Byers, B.R.; J.Bacteriol. 141, 715 (1980)
96. Cooper, S.R., Mc.Ardle, J.V., Raymond, K.N.; Proc. Natl. Acad. USA 75, 3551 (1978)
97. Langman, L., Young, J.G., Frost, G.E., Rosenberg, H., Gibson, F.; J. Bacteriol. 112, 1142 (1972)
98. Wong, G.B., Pecoraro, V.L., Klein, M.P., Raymond, K.N.; JACS, in press

99. Blinov, N.O., Blinova, I.N., Khokhlov, A.S. in: International Symposium on Antibiotics (1979, 14.-18. Mai), Weimar, GDR, C-11 .
100. Bauminger, E.R. et al. Biochim. Biophys. Acta 623, 237 (1980)
101. Dürr, M., Urech, K., Boller, T.; Arch. Microbiol. 121, 169 (1980)
102. Karlin, J.N., Bowman, B.J., Davis, R.H.; J. Biol. Chem. 251, 3948 (1976)
103. Marinoia, E., Heck, U., Boller, T., Wimken, A., Matile, p.; Arch. Microbiol. 120, 31 (1979)
104. Matilé, P.; Naturwissenschaften 66, 343 (1979)
105. Urech, K., Dürr, M., Boller, T.; Arch. Microbiol. 116, 275 (1978)
106. Müller, G.: Untersuchungen zur Energetisierung des Siderochrom-Eisentransports bei N.crassa, Dissertation, Tübingen (1981)
107. Trautwein, A.; Structure and Bonding 20, S.101 , Springer (Berlin, Heidelberg, New York), 1974
108. Trautwein, A., Maeda, Y., Harris, F.E., Formanek, H.; Theoret. Chim. Acta 36, 67 (1974)
109. Rao, K.K., Commanack, R., Hall, D.O., Johnson, C.E.; Biochem. J. 122, 257 (1971)
110. Dickson, D.P.E., Johnson, C.E., Commack, R., Evans, M. C., Hall, D.O., Rao, K.K.; Biochem. J. 139, 105 (1974)
111. Spartalian, K., Oosterhuis, W.T.; J.Chem. Phys. 59, 617 (1973)
112. Maeda, Y., Trautwein, A., Gonser, U., Yoshida, K., Kikudu-Torii, K., Homma, T., Orgura, J.; Biochim. Biophys. Acta 303, 230 (1973)
113. Wickman, H.H., Klein, M.P., Shirley, D.A.; Phys. Rev. 152, 345 (1966)
114. Bock, J.L., Lang, G.; Biochim. Biophys. Acta 264, 245 (1972)
115. Spartalian, K., Oosterhuis, W.T., Neilands J.B.; J. Chem. Phys. 62, 3538 (1975)
116. Boas, J.F., Window, B.; Aust. J. Phys. 19, 573 (1966)

117. Dickson, D.P.E., Rottem, S.; Biochem. J. in press
118. Bauminger, E.R., Cohen, S.G., Labenski de Kanter, F., Levy, A.,Ofer, S., Kessel, M., Rottem, S.; J.Bacteriol. 141, 378 (1980)
119. Kaufman, K.S., Papaefthymiou, G.C., Frankel, R.B., Rosenthal, A.; Biochim. Biophys. Acta 629, 522 (1980)
120. Rush, J.D., Dickson, D.P.E., Johnson, C.E., Hewitt, P.J., Lam, H.F.; Phys. Med. Biol. 20, 128 (1975)
121. Peccoraro, V.L., Wong, G.B., Kent, T.A., Huynh, B.H., Münck, E., Raymond, K.N.; JACS in press
122. Schoner, W.; Angew. Chemie 83, 947 (1971)
123. Berger, E.A., Heppel, L.A.; J. Biol. Chem. 249, 7747 (1974)
124. Brocklehurst,R., Gardew, D., Eddy, A.A.; Biochem. J. 162, 591 (1977)
125. Cockburn, M., Eaarshaw, P., Eddy, A.A.; Biochem. J. 146, 705 (1975)
126. Slayman, C.L., Slayman, C.W.; Proc. Natl. Acad. Sci USA 71, 1935 (1974)
127. Mitchel, P.; Advances in Enzymol. 29, 33 (1967)
128. Raven, J.A. in: Current Membrane Transport: Current Conceptual Issues (R.M. Spanswick, W.J.Lucas, J.Dainty; Eds.), Biomedical Press Elsevier/ North-Holland, S. 195 (1980)
129. Löw, H., Crane, F.L.; Biochim. Biophys. Acta 515, 141 (1978)
130. Cardin, D.J., Joblin, K.N., Johnson, A.W., Lang, G., Lapport, M.F. 365, 27 (1974)
131. Pedro, A., Lehman, F.; in: Receptors and Recognition 5 (P. Cuartecasas, M.F.Greaves, Eds.), Chapman and Hall (1978), S. 18.
132. Weber, G.; Adv. Protein Chem. 29, 1 (1975)
133. Hobza, P., Zahradnik, R. in: Weak Intermolecular Interactions in Chemistry and Biology, Elsevier/ North-Holland(Amsterdam, Oxford, New York), (1980), S.21
134. Frieden, E.; J.Chem. Educ. 52, 754 (1975)

135. Staab, H.A.; Einführung in die Theoretische Organische Chemie, Verlag Chemie(Weinheim), S.652 (197o)
136. Murakami, H., Mori, H., Taira, S.; J. Theor. Biol. 59, 1.(1976)
137. Hayward, R.C.; Nachr. Chem. Techn. Lab. 25, 15 (1977)
138. Knowles, J.R. in: Proc. 9 th Europ. Peptide Symp. (E.Bricas, Ed.), North-Holland Publishing Co, Amsterdam (1968), S.31o
139. Lehmann, F.P.A., de Miranda , R., Ariens, E.J.; Prog. Drug. Res. 2o, 1o1 (1976)
14o. Waring, M.J., Henley, S.M.; Nucleic Acids Res. 2, 567 (1975)
141. Llinás, M., Klein, M.P., Neilands, J.B.; J. Mol. Biol. 52, 399 (197o)
142. Llinás, M., Klein, M.P., Neilands, J.B.; J. Mol. Biol. 68, 265 (1972)
143. Llinás, M., Klein, M.P., Neilands, J.B.; J. Biol. Chem. 248, 924 (1973)
144. Emery, T.; Biochemistry 6, 3858 (1967)
145. Llinás, M., Wilson, D.M., Klein, M.P., Neilands, J.B.; J.Mol. Biol. 1o4, 853 (1976)
146. Hansch , C. in: International Encyclopedia of Pharmacology an Therapeutics, Section 5, Vol.I., Pergamon Press (Oxford), S.75 (1973)
147. Hansch, C.; Adv. Pharmacol. Chemother. 13, 45 (1975)
148. IUPAC-Nomenklatur:in: Inorg. Chem. 9, 1 (197o)
149. Leong, J., Raymond, K.N.; JACS 97, 293 (1975)
15o. Zuckerman, J.J. in: Adv. Organometal. Chem. 9, 71 (1971)
151. Clark, M.G.; Mol.Phys. 2o, 257 (1971)
152. Lovenberg, W., Buchanan, B.B., Rabinowitz, J.C.; J. Biol. Chem. 238, 3899 (1963)
153. Raymond, K.N., Kamal, A.D., Sofen, S.R. in:.Stereochemistry of Optically Active Transition Metal Compounds (B.E.Douglas, Y., Eds.), Am.Chem. Soc. Symposium Series No. 119 (washington D.C.), S.133 (198o)
154. Rastetter, W.H., Erickson, T.J., Venuti, M.C.; J. Org.

Chem. 45, 5o11 (198o)
155. van der Helm, D., Poling, M.J.; JACS 98, 82 (1976)
156. Wickman, H.H., Wertheim, G.K. in: Chemical Applications of Mössbauer Spectroscopy (V. Goldanskii, R.H. Herber, Eds), Academic Press (New York, London), S.548 (1968).
157. loc.cit. 113
158. Gütlich, P., Lenk, R., Trautwein, A.: Mössbauer Spectroscopy of Transition Metals, Springer (Berlin, Heidelberg, New York), 1979
159. Applications of Mössbauer Spectroscopy, Vol.1 (R.L. Cohen, Ed.), Academic Press (New York, S.Franzisko, London), 1976.
16o. Abragam, A., Bleaney, B.: Electron Paramagnetic Resonance of Transition Ions, Clarendon Press (Oxford), 197o
161. Topics in Applied Physics, Vol.5; Mössbauer Spectroscopy (E.Gonser, Ed.), Springer(Berlin, Heidelberg, New York), 1975
162. Morup, S.; Paramagnetic and Superparamagnetic Relaxation Phenomena Studied by Mössbauer Spectroscopy, Polyteknisk Forlag (Kopenhagen), 198o
163. Oosterhuis, W.T., Structure and Bonding 2o, 59 (1974)
164. Mössbauer Effct Data Index, Covering the 1971 Literature (J.G.Stevens, V.E.Stevens, Eds.), IFI/ Plenum Press.(New.York)
165. Greenwood, N.N., Gibb, T.C.; Mössbauer Spectroscopy, Chapman Hall (London), 1971
166. loc. cit. 158, S.18-2o, 6o-66
167. Cohen, M.H., Reif, F.; Solid State Physics 5, 324 (1957)
168. Pryce, M.H.L.; Phys. Rev. 8o, 11o7 (195o)
169. Watanabe, H.; Progr. Theoret. Phys. (Kyoto) 18, 4o5 (1957)
17o. Blume, M., Orbach,R.; Phys. Rev. 127, 1587 (1962)
171. Sharma, R.R., Das, T.P., Orbach, R.; Phys. Rev. 149, 257 (1966)

172. Cracknell, A.D.: Angewandte Gruppentheorie, Akademie-verlag(Berlin), 1971, S.198
173. Al'tshuler, S.A., Kozyrev, B.M. : Electron Paramagnetic Resonance, Academic Press (New York, London), 1964, S. 43 f.
174. Bleaney, B.K.W., Stevens, H.; Progr. Phys. 16 1o8 (1953)
175. Watson, R.E., Freeman, A.J.; Phys. Rev. 123, 2o27 (1961)
176. Meisel, W.: Die mößbauerspektroskopische Erfassung zeitlich und örtlich veränderlicher Größen. Dissertation, Deutsche Akademie der Wissenschaften, Berlin 1972
177. Afanas'ev, A.M, Kagan, Yu.M.; JETP Letters 8, 382 (1968)
178. Oosterhuis, W.T., Viccaro, P.J.; Biochim. Biophys. Acta 264 11 (1972)
179. Thomanek, U.F., Parak, F., Wintergerst, B.; Z. Naturforsch. 32c 11 (1977)
18o. Ehrenberg, A.; Nature 178 379 (1956)
181. Wickman, H.H., Klein, M.P., Shirley, D.A.; J. Chem. Phys. 42 2113 (1965)
182. Kronig, R.de L.; Physica 6 33 (1933)
183. van Vleck, J.H.; Phys. Rev. 426 (194o)
184. Orbach, R.; Proc. Roy. Soc. A 264 458 (1961)
185. Dowsing, R.D., Gibson, J.F.; J.Chem. Phys. 5o 294 (1968)
186. Wertheim, G.K., Guggenheim, H.J., Buchanan, D.N.E.; Phys. Rev. 169 465 (1968)
187. Pfletschinger, E.; Z.Physik 2o9 119 (1968)
188. De Benedetti, S., Lang,G., Ingalls, R.; Phys. Rev. Letters 6 6o (1961)
Kopplungskonstante:
Wignall, J.W.G.; J.Chem. Phys. 44 2462 (1966)
189. Trautwein, A., Harris, F.E., Freeman, A.J., Desclaux, Phys Rev. B 11 41o1 (1975)
19o. Emery, T., Emery, C.; Biochim. Biophys. Res. Commun. 5o 67o (1973)

191. Anderegg, G., L'Eplattenier, F.L., Schwarzenbach, G.; Helv. Chim. Acta 46 14o9 (1963)
192. Wong, G.B., Raymond, K.N., Matzanke, B.F.M., Winkelmann,G.; JACS in press
193. Neilands, J.B.; Science 156 1443 (1967)
194. Coulton, J.W., Braun, V. J. Gen. Microbiol. 11o 211 (1979)
195. Cramer, C.L., Vaugh, L. E., Davis, R.H.; J.Bacteriol. 142 945 (198o)
196. Crane, R.K.; Fed. Proc. 24 1ooo (1965)
197. Ernst, J.: Zur Bedeutung der Cytoplasmamembran für die Sideramin-Eisenaufnahme bei N.crassa. Dissertation, Universität Tübingen (1976)
198. loc.cit 87
199. Charlang, G.W., Horowitz, N.H.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68 26o (1971)
2oo. Charlang, G., Bradford, N.G, Horowitz, N.H., Horowitz R.M.; Mol. Cell.Biol. 1 94 (1981)
2o1. Hider, R.C., Drake, A.F., Kuroda, R., Neilands, J.B.; Naturwiss. 67 136 (198o)

LEBENSLAUF

23.8.1948	geboren in Stuttgart Bad Cannstatt
1955-1959	Grundschule in Stetten a.F.
1959-1960	Wilhelms-Gymnasium, Stuttgart
1960-1968	Schelztor-Gymnasium, Esslingen
20.6.68	Reifeprüfung
WS 1968-SS 1971	Chemie-Studium an der Technischen Hochschule in Stuttgart
26.10.1971	Vordiplom-Prüfung in Chemie
ab WS 1971	Chemie-Studium an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
ab SS 1975	Studium der Geschichte
9.76-7.78	Diplomarbeit
15.7.1978	Diplomprüfung in Chemie mit den Fächern: Anorganische Chemie, Organische Chemie, Physikalische Chemie
ab 10.78 bis 10. 81	Beschäftigung mit der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr.G.Winkelmann (Institut f.Mikrobiologie I) und Prof.Dr.W.Zeil(†), (Institut f. Theoretische und Physikalische Chemie. Nach dem Tode von Prof.Zeil übernahm Prof.Dr.V.Hoffmann die Betreuung des physikalisch-chemischen Teils.

Meine akademische Ausbildung verdanke ich:

E.Allenstein, E. Bayer, H. Bredereck, W.Braun, E. Fluck, Th. Förster, G.Gauglitz, J. Goubeau, G. Häfelinger, R. Hamm, V. Hoffmann, G. Jung, S. Kemmler-Sack, H. Kneser, H. Krebs, E. Lindner, I.P. Lorenz, E. Müller, H. Oberhammer, G.Pausewang, W. Rüdorff, W. Voelter, G. Winkelmann, H. Zähner, W. Zeil.